

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS DISSULFETO ISOMERASE NA
MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA EM UM MODELO SUÍNO DE
HIPOGONADISMO**

Ângela Maria Schorr Lenz

Lajeado, dezembro de 2014.

Ângela Maria Schorr Lenz

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS DISSULFETO ISOMERASE NA
MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA EM UM MODELO SUÍNO DE
HIPOGONADISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante
Filho

Lajeado, dezembro de 2014

Esse negócio de entender de uma coisa,
tem que amar.

Quando você ama,
isso cria uma capacidade.

Você se interessa pela coisa,
você começa a olhar.

Tom Jobim

DEDICO

Aos meus pais pela oportunidade da vida, pelo incentivo ao estudo, pela fonte
inesgotável de amor, carinho e respeito.
Ao Eduardo, por simplesmente me amar e estar ao meu lado nos melhores e piores
momentos desses últimos dezoito anos
À mim, por realmente acreditar que sou do tamanho dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

*E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar*

Caminhos do coração - Gonzaguinha

Agradeço aos meus pais, Véra e Roque, pelo exemplo de vida, de caráter e persistência. Por toda força que sempre me deram e, principalmente, pelo amor que não tem fim.

À minha irmã, Adriana, meu porto-seguro, meu exemplo de pessoa, de vida, de superação e conquistas, que sempre esteve ao meu lado, acompanhando e incentivando cada etapa, cada momento de felicidade ou dificuldade, agradeço por ser tão presente e especial na minha vida. Amor incondicional.

Ao Eduardo, meu esposo, fonte de inspiração e dedicação. Palavras me faltam para agradecer todo apoio e atenção dispensados durante essa e em todas as etapas que passamos juntos. Obrigada pelas planilhas, pelos cálculos, pela parceria nas noites frias e escuras no Laboratório do Biotec, pelo abraço apertado nos momentos de desespero, pelos conselhos remetendo à calma. Por ter secado minhas lágrimas tantas vezes e ao mesmo tempo, por ter sorrido e vibrado junto comigo ínfimas vezes. Te amo infinito.

Ao meu cunhado, Mouriac, pelo apoio dispensado e por ser aquele que sempre está disposto a fazer o possível para me ajudar, obrigada por tudo e por fazer parte da nossa família de maneira tão especial.

Ao Kilian e à Kauana, estrelas que iluminam minha vida. Mais que presentes nas atividades e compromissos da dinda. Obrigada pela ajuda na correção das

provas e por se fazerem integrantes da plateia nos ensaios para a qualificação e para a defesa da dissertação. Lamento pelas vezes em que tive que dizer “não” para a sessão de cinema, para o jogo de play, para os banhos de piscina. A partir de agora Uhuuuuu, vamos curtir. Amo vocês!

À Taís, minha amiga/irmã, presente e importante em tudo o que diz respeito a mim. Tem a palavra certa na hora certa, o arrepio conjunto na pele diante de situações, fala e escuta com o coração. Sempre disposta à ajudar, ensinar, a proporcionar momentos de muita gargalhada e diversão. A Lagoa e o Botânico não seriam os mesmos sem a nossa presença! Realmente, as coisas acontecem na hora em que precisam acontecer. Sinto-me privilegiada por ter te conhecido e por ter sua amizade.

À Mariana Anschau, doce e incrível menina que foi e é fiel conselheira, amiga, parceira imprescindível durante esse período. Tão diferentes por fora, mas indescritivelmente parecidas por dentro. Obrigada pelos snaps divertidos e pelas palavras sempre sinceras. É um prazer conviver contigo e te ter tão presente em minha vida!

Aos familiares e amigos que não participaram diretamente deste trabalho, mas que sempre muito me apoiaram. Nilse e Estela por, principalmente entenderem minha ausência e falta de tempo. Sandra e Itamar, pela amizade e torcida e também, por terem sido plateia nos ensaios para banca. Parceiros para toda hora.

Aos meus amigos e colegas de escola – as Apoptosas (Taís e Mariana) presentes mesmo na ausência. Participaram, por EAD, mesmo não querendo, de disciplinas e cursos feitos ao longo desses dois anos de mestrado. Obrigada pelas inúmeras vezes que me ouviram nas explicações mais loucas e longas sobre processos fisiológicos ligados à reprodução. Ao Mateus – o Todinho, pelo apoio incondicional de irmão. Obrigada pelo apoio, no dia 14 de janeiro de 2014, na minha banca de qualificação. À Gisele – a pretinha do meu coração, pelos conselhos, abraços e pela correção deste trabalho. Vocês não têm ideia do carinho que sinto por cada um!

À Patota – ahhhhhhh a Patota! O Mestrado, além de agregar conhecimento,

apresentou-me colegas e mestres que, com os quais quero seguir exemplo pelo profissionalismo, ética e sabedoria. Além desses, tive o prazer de conviver com pessoas de objetivos semelhantes aos meus e ao longo dos quatro semestres se colocaram lado a lado para que, juntos, alcançássemos nossas metas. Bruna, Henrique e Luciana, obrigada pela parceria, pelo companheirismo, pela cumplicidade. O que o mestrado uniu ninguém vai separar – Patota forever!

Ao grupo de Pesquisa em Reprodução Animal pelo apoio técnico durante a realização desse trabalho. Aos incríveis colegas Luis, Jayse, Pâmela, Franciele, Nicole e Elistone que fizeram tudo ser mais fácil e animado. Obrigada por cada momento. À Nicole, minha parceira direta no projeto, pelas conversas na sala escura e pelo suporte durante os experimentos. Por dizer (e não apenas com palavras) que serei sempre sua mestranda preferida! Imensamente agradecida. À Jayse, minha mascotinha, pela ajuda nos experimentos, pelos conselhos, pela atenção e por ser essa pessoa tão especial. Super companhia nas rodadas de cachorro-quente e guloseimas. Levarei-te para sempre em meu coração.

Aos integrantes da banca de qualificação, Professora Dra. Márcia Inês Goetttert, e Professora Dra. Maria Inês Jobim. Suas críticas construtivas e sugestões muito me ajudaram a aprimorar o conhecimento e o desenvolvimento desta pesquisa. Sou imensamente grata pela disponibilidade dispensada a minha pessoa.

Ao Pesquisador Dr. Adam M. Benham, da Durham University por, gentilmente, ceder anticorpos primários, indispensáveis para o desenvolvimento desta pesquisa.

À ACSURS, Cooperativa Languiru e BRF, na pessoa do Sr. Vanderlei Kobolt, Beto Marcus e Luis Machado pela disponibilidade e parceria para fornecer, gentilmente, amostras de testículos.

À CAPES e à UNIVATES, por me concederem bolsa PROSUP de estudos.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Segundo Júlio Camargo, “A vida é uma viagem a três estações: ação, experiência e recordação”.

Embarquei numa fantástica viagem no dia 01 de outubro de 2012 a bordo de um avião a jato, cujo comandante abria, naquele momento, um mundo de possibilidades e desafios. O destino era de certa forma desconhecido, pois ninguém sabia exatamente até onde a capacidade racional poderia nos levar, porém, os lugares por onde a aeronave passaria estavam perfeitamente planejados e criteriosamente estabelecidos. A data de chegada também estava determinada, mas eu sabia, já de antemão, que aquele instante não representaria um fim, pois quando se vive intensamente um momento ele não se desfaz num prazo, num período. Ele deixa lembranças e marcas para sempre tornando a viagem inesquecível.

Só tenho a agradecer a esse grande e respeitável comandante, meu orientador, Professor Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho que aceitou ter-me a bordo de seu Projeto como orientanda. Obrigada pelo desafio, incentivo e companheirismo em todas as fases do desenvolvimento desta pesquisa. Por me mostrar que, segundo a lógica e a “extatíxtica” da vida, precisamos organizar nosso tempo com tarefas profissionais sem deixar de curtir os prazeres que o mundo nos proporciona. Pois

“... o futuro é uma astronave que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade, nem tem hora de chegar
Sem pedir licença muda nossa vida
Depois convida a rir ou chorar”

Aquarela – Toquinho

RESUMO

Os processos fisiológicos, inclusive a maturação epididimária, são regidos por testosterona e estradiol e as proteínas secretadas pelas células epiteliais do túbulo do epidídimo são apontadas como efetoras desse processo. O hipogonadismo, condição resultante da disfunção testicular apresenta efeitos deletérios sobre os processos de espermatogênese e secreção hormonal. A correlação das funções das proteínas com atividade de chaperona da família das Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI) com alterações hormonais pode revelar relação de ação destas com a infertilidade em machos de diferentes espécies. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de descrever a presença das chaperonas PDIA1, PDILT e PDIA3 no epidídimo de suínos com hipogonadismo ocasionado pela imunocastração. Foram utilizados testículos de dezesseis animais, nove castrados cirurgicamente em rotinas zootécnicas (grupo controle) e sete machos imunocastrados com vacina Vivax (Pfizer). Espermatozoides e fluido epididimário das regiões de cabeça, corpo e cauda foram coletados, processados e o imunoconteúdo das PDI quantificado por Western Blotting. Os resultados demonstraram que, no grupo controle, o imunoconteúdo da PDIA1, PDIA3 e PDILT nos espermatozoides apresenta maior expressão nas regiões de cabeça e corpo ($P < 0,05$). Em relação ao fluido, observou-se o mesmo padrão de distribuição, com exceção da PDILT, que não apresentou diferença entre as regiões epididimárias. Porém, no grupo de imunocastrados, a quantificação dessas chaperonas demonstrou a presença das mesmas nas três regiões do epidídimo. Desta forma, a imunocastração influencia no imunoconteúdo de chaperonas da família PDI demonstrando uma possível associação destas a processos iniciais de maturação espermática.

Palavras-chave: Chaperonas. Maturação espermática. Hipogonadismo.

ABSTRACT

The physiological processes including epididymal maturation, are governed by testosterone and estradiol and secreted proteins by epithelial cells of tubule of the epididymis are identified as effectors of this process. Hypogonadism resulting condition of testicular dysfunction has detrimental effects on spermatogenesis processes and hormone secretion. The correlation functions of proteins with chaperone activity of Protein Disulfide Isomerase (PDI) family with hormonal changes can reveal action their relation to infertility in males of different species. This study was conducted with the objective of describing the presence of chaperones PDIA1, PDILT and PDIA3 in the epididymis of pigs with hypogonadism caused by immunocastration. This study was performed with tests in sixteen animals, nine castrated surgically in husbandry routines (control group) and seven males immunocastrated with Vivax vaccine (Pfizer). Epididymal sperm and fluid regions of the head, body and tail were collected, processed and immunocontent of PDIs quantified by Western blotting. The results showed that in the control group, the immunocontent of PDIA1, PDIA3 and PDILT in sperm has a higher expression in the head and body regions ($P < 0.05$). Regarding the fluid, we observed the same pattern of distribution, except PDILT, which showed not difference between the epididymal regions. However, in the immunocastrated group, the quantification of these chaperones demonstrated the presence of the same in the three regions of the epididymis. Therefore, the immunocastration influences the immunocontent of PDI family of chaperones showing a possible association of the initial processes of sperm maturation.

Keywords: Chaperones. Spermatogenic maturation. Hypogonadism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do testículo de suíno adulto destacando as principais regiões do epidídimo	23
Figura 2 – Evolução no processo de enovelamento do ducto do epidídimo de rato	24
Figura 3 - Processo de redução, oxidação e isomeração das PDIs	30
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura da PDI	31
Figura 5 - Localização celular das PDI e descrição de algumas interações com proteínas do RE (Retículo Endoplasmático) e de superfície celular.	32
Figura 6 - Regiões de coleta de amostras de tecido epididimário	38
Figura 7 - Fluxograma do protocolo de obtenção dos espermatozoides e fluidos epididimários	40
Figura 8 - Presença de PDIA1 em espermatozoides e fluidos obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachações controle e imunocastrados	44
Figura 9 - Presença de PDIA3 em espermatozoides e fluido obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachações controle e imunocastrados	45
Figura 10 - Presença de PDILT em espermatozoides e fluido obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachações controle e imunocastrados	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	71
Quadro 1 - B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	72
Quadro 1 - C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	73
Quadro 2 - A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	74
Quadro 2 - B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	74
Quadro 2 - C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	75
Quadro 2 - D: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	76
Quadro 3 - A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	77
Quadro 3 - B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	77
Quadro 3 - C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	78
Quadro 3 - D: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácidos

ADAM - A Disintegrin and Metalloprotease, *Disintegrina metalprotease*

AR – Receptor de andrógenos

Dpi – pontos por polegada

E2 – estradiol

ECL – do inglês *Enhanced Chemiluminescence*,

ERRO – Espécies Reativas do Oxigênio

FE – Fluido epididimário

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotropina

IA – Inseminação Artificial

kDa – kilodalton

KDEL – sequência de aminoácidos lisina – ácido aspártico – ácido glutâmico – leucina

LH – Hormônio Luteinizante

nCLU – Clusterina nuclear

PBS – phosphate *buffer saline*, tampão salina fosfato

PDI – Proteína Dissulfeto Isomerase

RE – receptor de estrogênio

RE – Retículo endoplasmático

SDS – Sódio dodecil sulfatoos

sCLU - clusterina secretória

T – Testosterona

TACE - enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
1.2 Justificativa	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Estrutura testicular e o processo de espermatogênese	20
2.2 O espermatozoide	22
2.3 O epidídimo e a maturação espermática	22
2.4 Regulação endócrina da espermatogênese	25
2.5 Modelo experimental suíno de hipogonadismo	27
2.5.1 Modelo experimental suíno de hipogonadismo	28
2.6 Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI)	29
2.6.1 Caracterização	31
2.6.2 Papel das PDI em processos fisiológicos e patológicos	32
2.6.3 PDIA1, PDILT e PDIA3 e suas implicações na função espermática	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Tipo de pesquisa	37
3.2 Animais de estudo	37
3.3 Investigação sobre as PDI em epidídimo suíno	38
3.4 SDS-PAGE e Western blotting	40
3.5 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	43
5 DISCUSSÃO	47

6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	71

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem na suinocultura um dos setores mais expressivos da atividade pecuária (SÜPTITZ *et al.*, 2009). Estudos e investimentos na área posicionaram o país em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína ficando logo abaixo da China, da União Europeia e dos Estados Unidos (BRASIL, 2013). Atualmente, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano (MAPA, 2013).

No estado do Rio Grande do Sul, a cadeia de produção de suínos encontra-se relativamente bem estruturada (MAPA, 2013). A criação de um sistema integrado de produção, que teve início na década de 1960, permitiu ganhos significativos de produtividade (VILLWOCK, 2003) através do estabelecimento de contratos de fornecimento de produto entre produtores e agroindústrias (COSTA *et al.*, 2001). Dessa forma, o sistema de integração na cadeia suinícola viabilizou a evolução tecnológica no setor através de contratos das agroindústrias com empresas detentoras da genética animal, da melhoria dos compostos de nutrição, da crescente inovação em equipamentos essenciais à produção e do desenvolvimento de um sistema de logística eficiente (MIELE; WAQUIL, 2007).

O melhoramento genético, impulsionado pelo uso da inseminação artificial (IA), proporcionou o aumento na qualidade da carne e melhorias nos parâmetros de ganho de peso, conversão alimentar, reduzida deposição de gordura e qualidade de

carcaça (MAPA, 2013). A castração, prática essencial para a suinocultura por ter eficiência no controle do odor de macho inteiro tem influência direta na qualidade e eficiência desses parâmetros (SILVEIRA *et al.*, 2006; McKEITH, 2009). Dentre as práticas, destaca-se a castração cirúrgica, método mais comum de controle do odor de macho inteiro e a imunocastração com o uso da vacina Vivax (Pfizer, Imporvac) que induz desordens endócrinas levando a uma função testicular prejudicada, caracterizando o hipogonadismo (MOVARELLI, 1996; FISCHER, 2004; CLARKE *et al.*, 2008; FRAIETTA *et al.*, 2013).

Estima-se que mundialmente mais de 95% dos machos sejam cirurgicamente castrados. Porém, em todos os estudos em que estes parâmetros foram mensurados, os machos imunocastrados demonstraram de maneira uniforme e significativa os parâmetros anteriormente citados (CLARKE *et al.*, 2008; McKEITH, 2009).

Estimativas mostram que no Brasil, o aumento da aplicação da técnica da IA teve grande expansão a partir de 1975, embora os primeiros estudos terem sido desenvolvidos a partir de 1959 (LAMBERSON, 2000; MIELE *et al.*, 2008).

Apesar dos progressos ocorridos nas últimas décadas quanto à utilização da IA, as características físicas e morfológicas do ejaculado nem sempre são garantia de bom desempenho reprodutivo e fertilidade nos cachos (FOXCROFT *et al.*, 2008). Desta forma, o desenvolvimento de métodos de caracterização da qualidade seminal que possuam maior acurácia e percepção além dos parâmetros físicos usados na rotina se faz necessário.

A abordagem proteômica do plasma seminal, fluido composto das secreções do testículo, epidídimo e glândulas anexas, já demonstrou a relação de proteínas presentes com características importantes como fertilidade e congelabilidade do sêmen em diferentes espécies (KILLIAN *et al.*, 1994; JOBIM *et al.*, 2004, 2011). Apesar de diversas proteínas já terem sido associadas às características seminais, poucos estudos abordaram a atividade efetiva destas no sêmen.

As proteínas secretadas pelas células epiteliais dentro do compartimento intraluminal do túbulo do epidídimo são as verdadeiras efetoras da maturação espermática, evento essencial para que o espermatozoide adquira habilidade de

percorrer o trato reprodutivo feminino e fertilizar o oócito (GIROUARD *et al.*, 2009). Contudo, para que efetuem suas atividades biológicas, devem estar em sua correta conformação terciária e quaternária no fluido epididimário.

Por estarem envolvidas no controle de qualidade de diversas proteínas que possuem papel fundamental na fertilização e formação do reservatório espermático tubário (BENHAM, 2012), as proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI) são potenciais marcadores moleculares de qualidade espermática, tanto na espermatogênese quanto na maturação epididimária. Suas atividades já foram relacionadas com a habilidade do espermatozoide se ligar à zona pelúcida do oócito e de percorrer o trato reprodutivo feminino via controle de conformação das proteínas de membrana espermática calmegin e calsperin (AKAMA *et al.*, 2010). Os processos fisiológicos, inclusive a maturação epididimária, são regidos por testosterona e estradiol, logo uma correlação das funções das PDI com alterações hormonais, pode revelar uma eventual relação da ação destas com a infertilidade em machos de diferentes espécies, inclusive a humana (DAVISON, 2012; McLACHLAN, 2013).

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos serão apresentados como objetivos geral e específicos.

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Buscando compreender o papel fisiológico das proteínas dissulfeto isomerase (PDI) na maturação espermática em suínos, a presente dissertação teve como principal objetivo descrever a presença das chaperonas PDIA1, PDILT e PDIA3 no fluido e espermatozoides de diferentes regiões do epidídimo de suínos castrados cirurgicamente e imunocastrados.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o conteúdo de PDIA1, PDILT E PDIA3 em espermatozoides e fluido epididimário das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de suínos castrados cirurgicamente e imunocastrados.

Correlacionar à quantificação das chaperonas PDIA1, PDILT E PDIA3 nas diferentes regiões do epidídimo com a maturação espermática.

Verificar e interpretar os efeitos da imunocastração de cachorros com a vacina Vivax® (Pfizer) no perfil das PDIs no epidídimo suíno.

1.2 JUSTIFICATIVA

Técnicas e ferramentas potenciais que visam incrementar o ganho genético em rebanhos e promover a otimização do uso de matrizes e reprodutores férteis são importantes e inovadoras alternativas na área de inseminação artificial em diversas espécies (STRZEZEK *et al.*, 2005). Com a crescente adoção da inseminação com baixa dose de espermatozoides ($< 2,5 \times 10^9$ espermatozoides), vem-se observando uma redução na eficiência reprodutiva de alguns cachorros, antes classificados como férteis (WATSON; BENHAM, 2002). Isto ocorre, pois o uso de doses inseminantes com alta concentração de espermatozoides pode mascarar indivíduos com problemas de fertilidade, resultado do efeito compensatório em parâmetros como motilidade e morfologia (BRAUDMEIER; MILLER, 2001). Assim, estudos que identifiquem o perfil proteico do sêmen de animais férteis representam um importante avanço que poderá avaliar sua capacidade de fecundar e ser classificado como marcador de animais mais aptos ou não ao uso em centrais de inseminação (TEIXEIRA, 2008).

O uso do modelo animal proposto neste estudo de hipogonadismo é inédito e poderá trazer novas informações sobre a influência endócrina na secreção de proteínas pelo epidídimo durante a maturação espermática. O hipogonadismo humano é uma condição clínica associada a 3% dos casos de infertilidade masculina, contudo alterações nos níveis de testosterona são encontrados em até 70% dos casos de infertilidade. Em animais domésticos estes dados não são conhecidos, porém alterações endócrinas podem estar relacionadas à diminuição da qualidade espermática em machos reprodutores em centrais de IA.

Desta forma, o presente estudo poderá contribuir para o conhecimento e desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas baseadas em marcadores

moleculares proteicos que possam viabilizar tratamentos e diagnósticos efetivos nas situações de infertilidade de machos doadores de sêmen.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção tem como objetivo revisar os principais tópicos teóricos que tangenciam o tema desta dissertação. Desta forma, serão abordados os aspectos atuais sobre o espermatozoide, o controle endócrino da espermatogênese, o epidídimo e a maturação espermática, o hipogonadismo e, finalmente, as proteínas dissulfeto isomerase, sua caracterização e o papel por elas desempenhado em processos fisiológicos e patológicos.

2.1 Estrutura testicular e o processo de espermatogênese

A estrutura testicular é composta pelo parênquima testicular envolto por uma túnica albugínea, que se infiltra separando o órgão em diferentes lóbulos (COSTA, 2003). É constituída por colágeno e fibras elásticas, células mioides e uma rede de vasos sanguíneos. O parênquima testicular ocupa entre 80 e 90% da massa testicular total, representando os túbulos seminíferos, aproximadamente 70% desse volume (SANTOS, 2011).

A porção intertubular é composta por aglomerados de células endócrinas, as células intersticiais ou de *Leydig*, responsáveis pela síntese de testosterona

devido ao LH liberado pela hipófise (GARTNER, 1999). Além dessas, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo constituem sua estrutura (NEVES, 2001; COSTA, 2003; VARNER; JOHNSON, 2007).

O sistema nervoso desempenha papel fundamental na regulação da atividade gonadal. A gametogênese e a secreção de hormônios ocorrem por meio de um mecanismo de retroalimentação endócrina das vias neurais e do controle imunoendócrino (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em resposta a testosterona produzida pelas células de *Leydig* (estimulado pelo LH hipofisário), células de Sertoli, estimuladas pelo FSH, presentes nas paredes dos túbulos seminíferos produzem uma grande variedade de mensageiros bioquímicos, que, através de diferentes vias de sinalização celular, estimulam a proliferação e a diferenciação de espermatogônias, espermátocitos primários e secundários, espermátides e espermatozoides (GARTNER, 1999).

As células de Sertoli também possuem funções importantes no que diz respeito ao suporte físico e nutricional da célula espermática e controle parácrino secretando proteínas, tais como a proteína de ligação de andrógeno (ABP) e a transferrina testicular que capta o ferro da transferrina sérica e conduz para os gametas em maturação. Da mesma forma, estimulam e promovem apoptose quando ocorre disfunção na espermatogênese, em especial quando há redução de testosterona (revisado por BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2005), e fagocitose de restos citoplasmáticos de espermátides durante o processo de espermiogênese (GRISWOLD, 1998; GARTNER, 1999).

Assim, entende-se que a espermatogênese é um processo altamente sincronizado e organizado onde células diploides (espermatogônias) se diferenciam no emaranhado de túbulos seminíferos, numa célula haploide madura (espermatozoide), liberada posteriormente para o epidídimo e ducto deferente (VARNER; JOHNSON, 2007). Em suínos, os primeiros ejaculados ocorrem entre o quinto e oitavo mês de idade sendo que o período de duração de um ciclo espermatogênico, da espermatogônia até o espermatozoide maduro é de 34,4 dias (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.2 O espermatozoide

Com a conclusão da espermatogênese, tem-se o espermatozoide, célula altamente especializada, com características morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas adaptadas para a transmissão do genoma masculino (SENGER, 2003). Caracterizado por ser uma célula alongada e achatada, é formado por três regiões altamente especializadas: a cabeça, peça intermediária e a cauda (VARNER; JOHNSON, 2007).

A cabeça se caracteriza por apresentar uma região na qual está contido o DNA, pequena quantidade de citoplasma e o acrossomo, estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo que contém várias enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A peça intermediária apresenta aproximadamente 100 a 150 mitocôndrias, relacionadas à produção de ATP (YANAGIMACHI, 1994) via fosforilação oxidativa (MANELLA, 2000). Estende-se do ponto de união da cauda com a cabeça espermática até o final da hélice mitocondrial. A região da cauda é composta por elementos do citoesqueleto (em especial microtúbulos), responsáveis pela motilidade da célula (MORTIMER, 1997; SENGER, 2003).

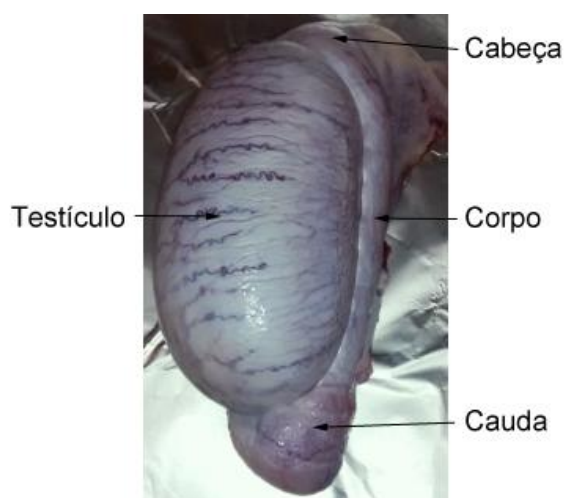
Fazendo-se uma análise desse contexto, é necessário ressaltar que o espermatozoide é o produto final da espermatogênese, porém, mesmo se tratando de um processo extremamente complexo, a célula não se apresenta completamente apta para exercer sua função na fecundação (VARNER; JOHNSON, 2007). O epidídimo é crucial para a maturação espermática (DACHEUX; DACHEUX, 2002) e as secreções das glândulas sexuais acessórias liberadas durante o trânsito epididimário influenciam várias funções espermáticas como a capacitação, reação acrossômica e motilidade (WAY *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2007a), além de provavelmente interferir na fertilização (MOURA *et al.*, 2007b).

2.3 O epidídimo e a maturação espermática

Desde a primeira edição da publicação do artigo *Fisiologia da Reprodução* em

1988, importantes estudos marcaram o desenvolvimento do conhecimento acerca do sistema funcional epididimário, onde suas estruturas básicas, funções e regulação começavam a ser compreendidas (ROBAIRE *et al.*, 2006). O epidídimo consiste em um longo ducto, altamente contorcido que conecta os canais eferentes ao ducto deferente. O comprimento do ducto epididimário varia conforme a espécie, alcançando 9 metros na espécie humana (HINTON *et al.*, 2011), 25 metros em suínos e até 80 metros em equinos (OLIVA *et al.*, MARIEB *et al.*, 2009). Apresentando forma alongada com extremidade distal mais dilatada em relação à proximal, é classicamente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (Figura 1), entretanto, quatro regiões anatômicas: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, foram descritas pela primeira vez em 1926 por BENOIT (ROBAIRE *et al.*, 2006).

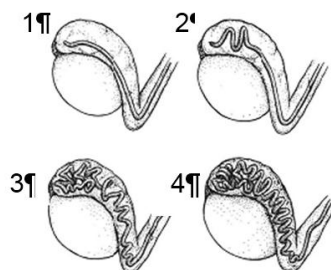
Figura 1 – Testículo e epidídimo suíno adulto; Setas indicam o testículo e as três regiões do epidídimo.



Fonte: Da autora

A descrição mais detalhada de desenvolvimento pós-natal do epidídimo é a do rato. Ao nascer, o epidídimo do animal sofre um considerável enovelamento na região proximal (segmento inicial) completando o processo na região da cauda (Figura 2) (ROBAIRE *et al.*, 2006). A cabeça, a qual contém os ductos deferentes, cobre a face superior dos testículos e o corpo e cauda estão na área póstero-lateral (MARIEB *et al.*, 2009).

Figura 2 – Evolução no processo de enovelamento do ducto do epidídimo de rato.



Fonte: ROBAIRE *et al.*, (2006).

Algumas células do epitélio pseudo-estratificado da mucosa do ducto apresentam estereocílios, microvilosidades longas e imóveis. A grande área de superfície desses estereocílios permite a absorção do excesso de fluido epididimário e a nutrição dos espermatozoides armazenados temporariamente no lúmen (MARIEB *et al.*, 2009). O epidídimo é revestido por um músculo liso (Benham, 2012) possuindo inervação adrenérgica proximal para regiões mais distais. O mecanismo responsável pela condução dos fluidos através do lúmen do epidídimo tem sido atribuído principalmente a rítmicas contrações desse músculo (ROBAIRE *et al.*, 2006). Os mecanismos que regulam o crescimento e a diferenciação do ducto epididimal são desconhecidos, embora seja claro que a expressão de muitos genes epididimários é regulada certamente, por andrógenos circulantes luminais (ROBAIRE *et al.*, 2006).

Dentre as funções do epidídimo, destacam-se o transporte de espermatozoides, desenvolvimento de motilidade espermática, desenvolvimento da capacidade de fertilização, bem como a criação de um ambiente luminal propício, especializado no processo de maturação através da absorção e secreção de substâncias (ROBAIRE *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007). Os espermatozoides imaturos, quase imóveis, que deixam os testículos são lentamente movidos ao longo do ducto do epidídimo pelo fluido que contém várias proteínas antimicrobianas, incluindo diversas β -defensinas (MARIEB *et al.*, 2009). O tempo de trânsito total através de cada segmento do epidídimo pode ser estimado a partir da razão de reservas de espermatozoides e produção de sêmen testicular diária (ORGEBIN-CRIST, 2008) e independentemente do tamanho do animal, da sua produção de espermatozoides ou de suas reservas de fluido epididimário, o tempo mínimo necessário para a passagem de espermatozoides através do mesmo é de

aproximadamente dez dias (ROBAIRE *et al.*, 2006). Em suínos, o tempo de trânsito dos espermatozoides ao longo do epidídimo é de 10,2 dias (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

De acordo com Adashi *et al.* (2003), algumas características do fluido epididimário sofrem alterações substanciais na composição durante a maturação do trânsito epididimário. Estas envolvem tanto o aumento quantitativo no percentual de espermatozoides móveis quanto uma diferença qualitativa no padrão de motilidade (FÀBREGA *et al.*, 2012). Além destas alterações funcionais, os espermatozoides sofrem também alterações estruturais onde a migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo, a reformulação acrossomal e as alterações de membrana celular (BEDFORD, 2004) constituem a base da maturação estrutural. Porém, nenhuma destas alterações demonstrou ser o único fator determinante da aquisição da capacidade fertilizante (ROBAIRE *et al.*, 2006).

Muitas alterações na membrana dos espermatozoides, que coincidem com a maturação espermática, são mediadas por proteínas secretadas em regiões restritas do ducto epididimário, algumas das quais são andrógeno-dependentes e por associações subsequentes dessas proteínas com os espermatozoides (OLIVA *et al.*, 2009). Em uma análise realizada em sêmen de touros, Cancel *et al.* (1999), afirmam que proteínas secretadas pelo epidídimo e células dos túbulos seminíferos e glândulas acessórias influenciam de forma significativa na capacidade hábil dos espermatozoides. Essa influência parece potencializar a fecundação, com efeitos nos índices reprodutivos e taxa de prenhez, associados a cada reprodutor.

O fluido das glândulas sexuais acessórias contém proteínas que influenciam direta ou indiretamente os mecanismos envolvidos na prevenção da integridade da membrana espermática contra danos causados pelo estresse oxidativo e resposta imunológica (MOURA *et al.*, 2007).

2.4 Regulação endócrina da espermatogênese

A produção efetiva de espermatozoides depende do cumprimento de ações endócrinas de dois hormônios gonadotrópicos secretados e sintetizados pela

glândula hipófise em resposta ao hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) do hipotálamo: o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (SENGER, 2003). A síntese do hormônio testosterona, essencial na iniciação e manutenção da espermatogênese, é estimulada pela ação do LH através do controle da funcionalidade de receptores de andrógenos e FSH que estão presentes nas células de Leydig e células de Sertoli, respectivamente (ZIRKIN, 1998, FRAIETTA *et al.*, 2013).

Na espécie suína, blastocistos sintetizam estrógenos por volta do décimo segundo dia. Os testículos fetais secretam testosterona durante a diferenciação da genitália interna e externa, sendo as concentrações de testosterona sérica baixas durante a segunda metade do desenvolvimento fetal. A produção de testosterona no final da vida fetal torna-se dependente de gonadotrofina. LH, FSH e prolactina séricos alcançam os níveis de pico durante a primeira semana após o nascimento e então, diminuem gradualmente pela sétima semana. A elongação dos túbulos seminíferos provavelmente é aumentada nesse momento pela estimulação do FSH sobre as células de Sertoli (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A ausência da testosterona ou do receptor de andrógenos (AR) nas células de Sertoli compromete a formação da barreira hematotesticular e as células germinativas não se desenvolvem além da meiose (ROBAIRE *et al.*, 2006, FRAIETTA *et al.*, 2013). Sendo assim, as células germinativas imaturas são deslocadas prematuramente a partir das células de Sertoli e o processo de espermição fica comprometido (WALKER, 2003).

Testículos aumentam de seis para 120 gramas em suínos de 40 a 250 dias de idade. As concentrações de testosterona no plasma periférico aumentam conforme o desenvolvimento puberal progride e declina próximo à maturidade. Tanto em cachos pré-púberes como em adultos, a injeção intravenosa de hormônio liberador de LH (LHRH) causa a liberação de níveis de pico de LH em dez minutos. A testosterona e seu metabólito α -deidrotestosterona (5α -DHT), provocam tanto efeito estimulatório como inibitório na secreção de LH do cacho. A implantação intracerebral direta de 5α -DHT ou testosterona no hipotálamo médio-basal ou na amígdala inibe a liberação de LH da hipófise. Desse modo, os andrógenos modulam

a secreção de hormônios hipotalâmicos, os quais, por sua vez, controlam a liberação de LH pela adeno-hipófise no cachaço (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A testosterona apresenta um papel fundamental na puberdade do reprodutor suíno, sendo que esta prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo e estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, como próstata, glândulas vesiculares e bulbouretrais, ductos deferentes e características corporais que, em geral, são associadas ao macho (HAFEZ, 1995). As características sexuais secundárias como comportamento sexual e a libido do macho também são algumas características periféricas influenciadas pela testosterona e fundamentais ao sucesso reprodutivo (MURGAS, 1999, FRAIETTA *et al.*, 2013).

2.5 Hipogonadismo

A espermatogênese e a secreção adequada de hormônios são reguladas por componentes endócrinos constituídos por um sistema integrado entre hipotálamo, hipófise e testículos (FRAIETTA *et al.*, 2013). Desordens endócrinas afetam diretamente esses processos levando a uma função testicular prejudicada, caracterizando o hipogonadismo (CLARK *et al.*, 1992; HESS *et al.*, 1997a, b; SHARPE, 1997; MOCARELLI, 1996).

Embora a prevalência exata desta condição seja desconhecida, o hipogonadismo masculino pode resultar de uma desordem testicular primária, caracterizada pelos baixos níveis de testosterona e níveis elevados de hormônio FSH e exposição a agentes gonadotóxicos, ou surgir de uma disfunção secundária do sistema hipotálamo e hipófise (FRAIETTA *et al.*, 2013). Desta forma, a infertilidade do macho pode apresentar características multifatoriais, ocasionadas por desordens do tipo congênitas ou adquiridas (WALKER, 2003; FISCHER, 2004).

Uma hipótese apresentada para explicar mudanças na qualidade do sêmen envolve disruptores endócrinos. Este grupo de moléculas inclui uma variedade diversificada e heterogênea de substâncias químicas naturais e sintética

suscetíveis a ter efeitos adversos sobre o organismo por meio de atividades anti-androgênicas, interferindo no desenvolvimento das gônadas e na função pós-natal do testículo (FRAIETTA *et al.*, 2013). Outra, descreve algumas funções de proteínas presentes nas células de linhagem espermatogênica. Dentre estas, a PDIA1, PDILT e PDIA3, chaperonas abordadas no presente estudo fazem parte, evidenciando sua importância na produção de espermatozoides aptos a fertilizar (VAN LITH *et al.*, 2007; IKAWA *et al.*, 2011).

2.5.1 Modelo experimental suíno de hipogonadismo

Este modelo experimental é baseado no uso de machos suínos púberes imunocastrados. O antígeno presente na vacina Vivax (Improvac, Pfizer) é um análogo sintético e incompleto do GnRH, conjugado a uma proteína carreadora para torná-lo imunogênico; isto é, para ajudar a desencadear uma resposta imunológica. A combinação é bastante similar ao GnRH natural e auxilia na produção de anticorpos que neutralizam o GnRH natural; porém, é diferente o bastante para não possuir atividade hormonal (CLARKE *et al.*, 2008).

A primeira dose da vacina, aplicada em animais de oito a nove semanas de idade, sensibiliza o sistema imune do suíno, mas não altera o tamanho ou a função dos testículos. A segunda dose deve ser administrada pelo menos 4 semanas depois da primeira dose, e recomenda-se que seja no máximo até 4 ou 5 semanas antes do período de abate. Esta estimula a resposta imunológica que inibe a função testicular (BERNAL *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2008).

Machos suínos inteiros (não castrados) não podem ser abatidos, pois metabólitos da testosterona se depositam na carne e gordura, dando odor desagradável à mesma. Tradicionalmente, a castração cirúrgica de leitões machos tem sido o método preferido para combater o odor de macho inteiro, e estima-se que 95% da população mundial de suínos machos seja castrada cirurgicamente (DUNSHEA *et al.*, 2005; BERNAL *et al.*, 2006). Contudo, esse procedimento apresenta uma série de desvantagens inerentes do ponto de vista comercial, pois o processo por si só consome tempo e mão-de-obra por parte do produtor, traz riscos

de infecção e de aparecimento de hérnias que, na melhor das hipóteses, requerem tratamento e atrasam o desenvolvimento do animal, e, na pior das hipóteses, contribuem para o aumento da taxa de mortalidade (BERNAL *et al.*, 2006).

Assim, a imunocastração vem sendo utilizada em diversos países, e no Brasil é o procedimento padrão de várias empresas integradoras. Seus efeitos fisiológicos foram descritos por Einarsson *et al.* (2011), que observaram níveis séricos médios de testosterona de 0,04 ng/mL em suínos imunocastrados, valor 35 vezes menor que os animais controle (1,4 ng/mL). Os autores destacaram ainda uma importante diminuição do tamanho testicular, com redução das células da linhagem espermatogênica nos túbulos seminíferos após a aplicação da vacina. Brunius *et al.* (2011), descrevem também os efeitos da vacina Vivax (Improvac, Pfizer) nos níveis plasmáticos de estradiol 17- β , sendo 4,31 pg/mL para animais inteiros, 0,34 pg/mL para animais castrados e 0,56 pg/mL para animais imunocastrados.

2.6 Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI)

As PDI são responsáveis por participar de importantes processos fisiológicos como a modulação da atividade da fosfatase da miosina, proteína indispensável à contração muscular (SITIA, 2003) e destacam-se por atuar na manutenção conformacional das proteínas recém formadas, especialmente daquelas destinadas à superfície celular e que não estão sob a vigília direta de chaperonas (RIEMER *et al.*, 2009). Desta forma, possuem um papel de destaque dentro dos processos biológicos (MORAES *et al.*, 2012). Embora o estudo bioquímico acerca das proteínas dissulfeto isomerase datar da década de 60, a compreensão a nível molecular é recente (BENHAM, 2012).

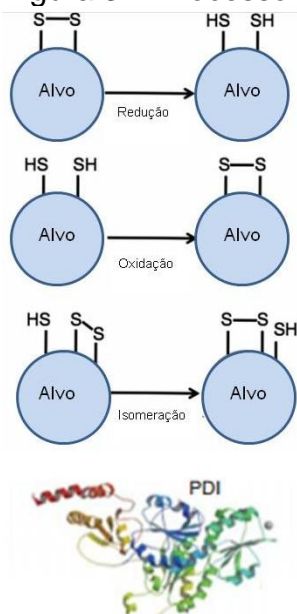
São encontradas em todos os organismos multicelulares atuando prioritariamente no retículo endoplasmático (RE), porém a coordenação da conformação de proteínas *in vivo* ainda é pouco conhecida (VAN LITH *et al.*, 2007). Todavia, mesmo sem se conhecer todo o processo (BENHAM, 2012), sugere-se que os eventos que regem a conformação proteica e o controle de qualidade da síntese

de peptídeos são questões centrais em doenças como o diabetes (OZCAN *et al.*, 2006) e a doença de Alzheimer (UEHARA *et al.*, 2006).

As oxidoreduktases ditiólicas, especialmente aquelas pertencentes à superfamília das tioredoxinas, são enzimas reconhecidamente importantes na ativação de vias de sinalização redox (EBRAHIMIAN; TOUYZ, 2008) principal responsável pela variedade de funções atribuídas a elas (LAURINDO *et al.*, 2008). Dentre os membros da superfamília das tioredoxinas, encontram-se as Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI), chaperonas com atividade redox oriunda do RE (DIAS, 2011). Esta família partilha propriedades estruturais comuns, além de apresentar características únicas relacionadas com os sítios de ligação ao substrato e a outras proteínas existentes do RE (KOZLOV *et al.*, 2010).

As PDI são as únicas capazes de catalisar reações de isomeração, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes dissulfeto através de ciclos repetidos de oxidação, redução e isomeração. Estas ligações de dissulfeto (S-S) são formadas entre os grupos-SH em resíduos de cisteína dentro da mesma cadeia polipeptídica ou entre diferentes peptídeos, no caso de proteínas multiméricas (Figura 3) (DIAS, 2011; BEHNAM, 2012). Uma grande variedade de proteínas sofre modulação conformacional através de pontes dissulfeto, e são consideradas, assim, alvos de PDI (BEHNAM, 2012).

Figura 3 – Processo de redução, oxidação e isomerização das PDIs



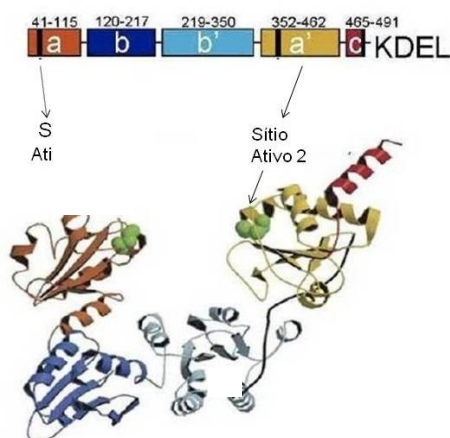
Fonte: Adaptado de BENHAM, (2012).

2.6.1 Caracterização

As PDI são proteínas de massa molecular aproximada de 55 KDa, e sua organização compreende cinco domínios semelhantes à tiorredoxina a, a', b e b'. Também apresentam um domínio carboxi-terminal denominado de c (Figura 4). Nos domínios a e a' localizam-se os dois sítios catalíticos independentes da enzima, cujas cisteínas reativas localizam-se na sequência Trp-Cys-Gly-His-Cys (NOIVA, 1999; WILKINSON; GILBERT, 2004).

As diversas atividades exercidas pelas PDIs são realizadas nos diferentes estados redox destes sítios, os quais podem se encontrar no estado reduzido ditiol ou no estado oxidado dissulfeto (LAURINDO *et al.*, 2008). Os domínios b não são catalíticos, entretanto, o domínio b' apresenta uma larga superfície hidrofóbica, identificada como principal responsável pelo reconhecimento e ligação das PDIs aos seus substratos (DENISOV, 2007; BYRNE, 2009). Já o domínio carboxi-terminal c, apresenta a sequência KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de retenção no retículo endoplasmático e tem sido considerado um sítio de ligação ao cálcio (WILKINSON; GILBERT, 2004; LAURINDO *et al.*, 2008).

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura da PDI

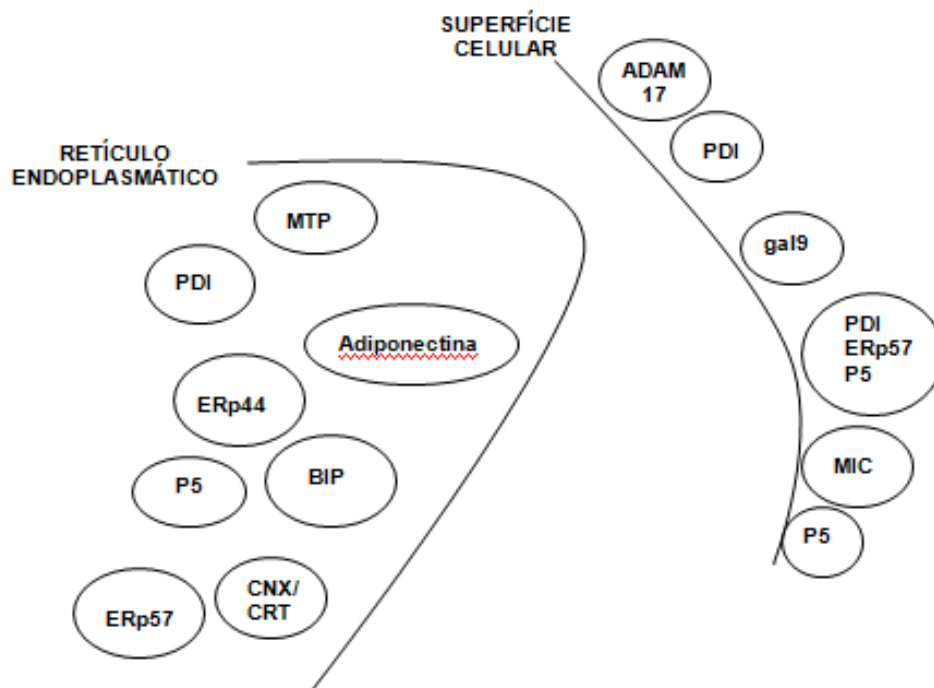


Fonte: Ilustração adaptada de LAURINDO *et al.* (2008).

Dentre as funções das PDI, pode-se citar a catálise da oxidação de cisteínas para formação de pontes dissulfeto, processo que auxilia o enovelamento de proteínas, bem como a redução e rearranjo de pontes dissulfeto em proteínas (DIAS, 2011).

Conforme a Figura 5, recentes estudos tem demonstrado a função de ativação funcional das PDIs em relação a outras proteínas no retículo endoplasmático e na superfície celular e as interações estabelecidas entre as mesmas (BENHAM, 2012).

Figura 5: Localização celular das PDI e descrição de algumas interações com proteínas do RE (Retículo Endoplasmático) e de superfície celular.



Fonte: Adaptado de BENHAM, (2012).

2.6.2 Papel das PDI em processos fisiológicos e patológicos

A família PDI é formada por 20 membros que partilham propriedades estruturais comuns, mas também apresentam características únicas relacionadas com os sítios de ligação ao substrato e a outras proteínas residentes do RE, que são responsáveis pela especificidade das interações com o substrato e pelas propriedades funcionais (KOZLOV *et al.*, 2010).

Em leveduras, são proteínas vitais, uma vez que qualquer redução substancial de sua expressão pode comprometer a viabilidade celular (DIAS, 2011). Em células de mamíferos sua expressão mantém a sobrevivência celular e o

aumento destas melhora a resistência em células endoteliais (TANAKA *et al.*, 2000; GRAVEN *et al.*, 2002; SULLIVAN *et al.*, 2003). Estudos realizados em ratos demonstraram que a atuação dessas chaperonas junto ao tecido plaquetário ativa a produção de fibrina (REINHARDT *et al.*, 2008).

A função e o papel das PDI dentro e fora do RE são importantes tanto na saúde quanto em quadros de doenças atuando diretamente no sistema imunológico. Há evidências de que a entrada de alguns vírus em células eucarióticas é governada por processos redox. Além disso, possuem relevância em processos que requerem modificações de adesão ou migração celulares, como em situações de câncer, onde a PDIA5, proteína da família das PDI, facilita a dissociação das proteínas associadas ao tumor, reduzindo as pontes dissulfeto na superfície da célula tumoral (BENHAM, 2012).

Em um experimento com proteínas de superfície celular transmembrana – as ADAM (*Disintegrina metalproteinase*), cujas funções essenciais estão relacionadas à adesão espermática e processamento proteolítico em todos os animais, atuando, principalmente, como sinalizadores moleculares e na ativação imunológica, WILLEMS *et al.*, (2010), observaram que alterando a atividade das PDIs nessas células, ocorre a mudança da atividade de ésteres de forbol através da ação da ADAM17 (que é controlada pelas PDIs). Neste estudo foi proposto que as PDIs mantêm a ADAM17 em um estado inativo e a exposição a um ambiente redox inativa a PDI permitindo a ADAM17 adotar uma conformação ativa. Esta ativação é acompanhada por alterações nas pontes dissulfeto no ectodomínio ADAM17. Esta é uma descoberta nova que poderia ajudar a desvendar as alterações dos mecanismos de ação das ADAM, bem como uma série de outros mecanismos que dependem de modificações rápidas na conformação de proteínas de superfície celular (BASS, 2010).

2.6.3 PDIA1, PDILT e PDIA3 e suas implicações na função espermática

A conformação ideal de uma proteína é caracterizada pela estabilização estrutural e exatidão de propriedades bioquímicas que permitirão que ela

desempenhe sua função específica dentro da célula (IKAWA *et al.*, 2011). Embora esteja provado, através de experiências *in vitro*, que toda a informação necessária à conformação de uma proteína está contida na sua sequência polipeptídica, estudos demonstram que muitas proteínas recém-sintetizadas necessitam de energia metabólica para alcançarem seus estados funcionais estruturais eficientemente (RAMOS, 2008). Além disso, necessitam de chaperonas capacitadas a orientar a conformação terciária adequada, prevenindo agregações peptídicas não-específicas e reparando proteínas danificadas (LAURINDO *et al.*, 2008).

Importantes similaridades fisiológicas e morfológicas demonstraram que a espécie suína é um excelente modelo animal para estudos e transposição em humanos, entretanto, apenas recentemente o papel das chaperonas começou a ser explorado com relação a fisiologia reprodutiva desses animais. Algumas funções de chaperonas nas células da linhagem espermatogênica já foram descritas, evidenciando a importância destas na produção de espermatozoides férteis (VAN LITH *et al.*, 2007; IKAWA *et al.*, 2011).

De acordo com Benham (2012), membros da família PDI têm atraído interesse em pesquisa sobre fertilidade, onde rearranjos de ligações dissulfeto são necessárias para que proteínas de adesão do espermatozoide possam se ligar ao oócito. Sundhey *et al.* (1995), num estudo com caprinos descreveram que a concentração de proteínas presentes na membrana do espermatozoide aumentava durante a maturação epididimária. Brandon *et al.*, (1999), ao correlacionarem as proteínas SP-1, SP-2, SP-3 e SP-4 do plasma seminal de equinos com a fertilidade, afirmaram que estas podem ser usadas como indicadores de capacidade fertilizante. Da mesma forma que as chaperonas podem ser descritas pela sua análise direta no sêmen ejaculado e epididimário, pode-se inferir sobre sua função pela investigação de proteínas nas quais elas atuam no controle de qualidade.

Dentre as proteínas investigadas no presente estudo, a PDIA1 ou P4HB (do inglês *prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide*), é uma chaperona relacionada à fertilização mediando o controle de qualidade e a função de integrinas e proteínas da família ADAM (*Disintegrina metalprotease*) (EDWARDS *et al.*, 2009). Num estudo com camundongos *knock-out*, as proteínas ADAM1 (*fertilin- α*), ADAM2 (*fertilin- β*) e

ADAM3 (*cyrtestin*) foram associadas a eventos como a adesão do espermatozoide à zona pelúcida, adesão do espermatozoide à membrana plasmática do oócito e a fusão das membranas dos gametas (EDWARDS *et al.*, 2009; revisado por MORENO *et al.*, 2011). Estas três proteínas de membrana são sintetizadas como precursores, tendo os domínios pro e metaloprotease removidos proteoliticamente durante a maturação epididimária (HUNNICUTT *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004; FÀBREGA *et al.*, 2011). Desta forma, alterações na expressão e atividade das PDIs no epidídimo podem afetar a qualidade e potencial fecundante do sêmen.

Pertencente à família das PDIs, a PDILT, proteína também abordada neste estudo, catalisa a formação, isomerização e redução de pontes de dissulfeto no retículo endoplasmático. Foi descrita como sendo exclusivamente expressa no testículo (VAN LITH *et al.*, 2005), mais especificamente em células espermáticas pós-meiose, formando complexos com outras chaperonas como a calmegina e calnexina (VAN LITH *et al.*, 2007). Tal achado sugere que esta proteína tenha importante papel no remodelamento celular meiótico, em especial na formação do acrossoma a partir do RE (BENHAM, 2012).

Atuando na oxiredução de ligações tiol e dissulfeto de proteínas em fase de maturação pós-síntese, encontra-se a PDIA3 também conhecida por ERp57 – (*endoplasmic reticulum protein 57*) – chaperona que promove interações com outras chaperonas da família PDI (VAN LITH *et al.*, 2007) e a chaperonas moleculares do RE calnexina (CNX) e à calreticulina (CRT) para catalisar a formação e isomerização de ligações dissulfeto (TURANO *et al.*, 2011). A PDIA3 está envolvida na modulação da atividade da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarco/endoplasmático (SERCA - *sarco/endoplasmic reticulum Ca}^{2+} ATPase), que transporta íons de cálcio para o RE, através da regulação do estado de oxidação-redução dos grupos sulfidrílica de sua porção luminal (COE; MICHALAK, 2009, 2010).*

No testículo, a PDIA3 foi imunolocalizada em todas as células da linhagem espermatogênica e células de Leydig, porém com uma fraca marcação em células de Sertoli. Em espermatozoides, foi demonstrada a sua imunomarcação em todo o acrossoma, região equatorial e cauda. Este fato sugere importante papel na capacitação espermática e fusão de gametas, tornando esta proteína possível

candidata a marcador molecular de fertilidade (ZHANG *et al.*, 2007). O remodelamento das integrinas na superfície dos gametas é o possível mecanismo na qual age esta chaperona na fertilização (BENHAM, 2012).

O entendimento das funções das diferentes PDI na espermatogênese e maturação espermática no epidídimo pode elucidar outras questões referentes aos fenômenos bioquímicos e morfológicos que regem a formação de um espermatozoide apto a fertilizar o oócito, seja *in vivo* ou *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de Pesquisa

O tipo de pesquisa da presente dissertação é classificado como sendo transversal, descritiva e explicativa. Utilizou uma abordagem quantitativa, uma vez que combinou dados investigativos e mensuráveis obtidos através da experimentação.

3.2 Animais de estudo

Os experimentos foram realizados com testículos de suínos púberes (8 e 18 meses) provenientes de doação da Cooperativa Languiru com sede em Teutônia/RS e da empresa Brasil Foods (BRF), com abatedouro localizado em Lajeado/RS.

Para análise das PDI nos espermatozoides e fluido epididimários, foram utilizados nove testículos de reprodutores castrados cirurgicamente em rotinas zootécnicas e sete testículos de machos imunocastrados.

A presente pesquisa dispensou a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais por não executar qualquer manipulação ou intervenção e por utilizar material de descarte, estando assim amparada no parágrafo terceiro do artigo 1º da lei que regulamenta a experimentação animal no Brasil (Lei 11.794 de 2008), conforme descrito abaixo:

Art. 1º - A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II– estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

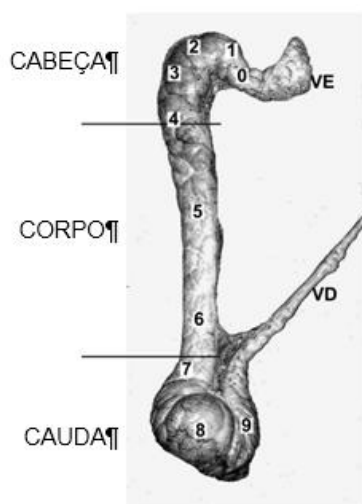
§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

3.3 Investigação sobre as PDI em epidídimo suíno

Os testículos, após castração cirúrgica ou abate, foram transportados até o Laboratório de Biotecnologia da UNIVATES sob refrigeração a 4°C, num tempo máximo de 30 minutos após procedimento inicial. Após dissecação, amostras de tecido foram removidas das regiões da cabeça (1), corpo (5) e cauda (9) do epidídimo, conforme descrição realizada por FÀBREGA *et al.*, (2011) (Figura 6).

O material fatiado, equivalente a 150 mg, foi acondicionado em tubos eppendorf devidamente identificados, acrescido com 200 a 500 µL de PBS, e, posteriormente, agitado em vórtex para coleta dos espermatozoides do interior do ducto epididimário.

Figura 6 – Regiões de coleta de amostras de tecido epididimário. VE – Vias eferentes; VD – Vias deferentes



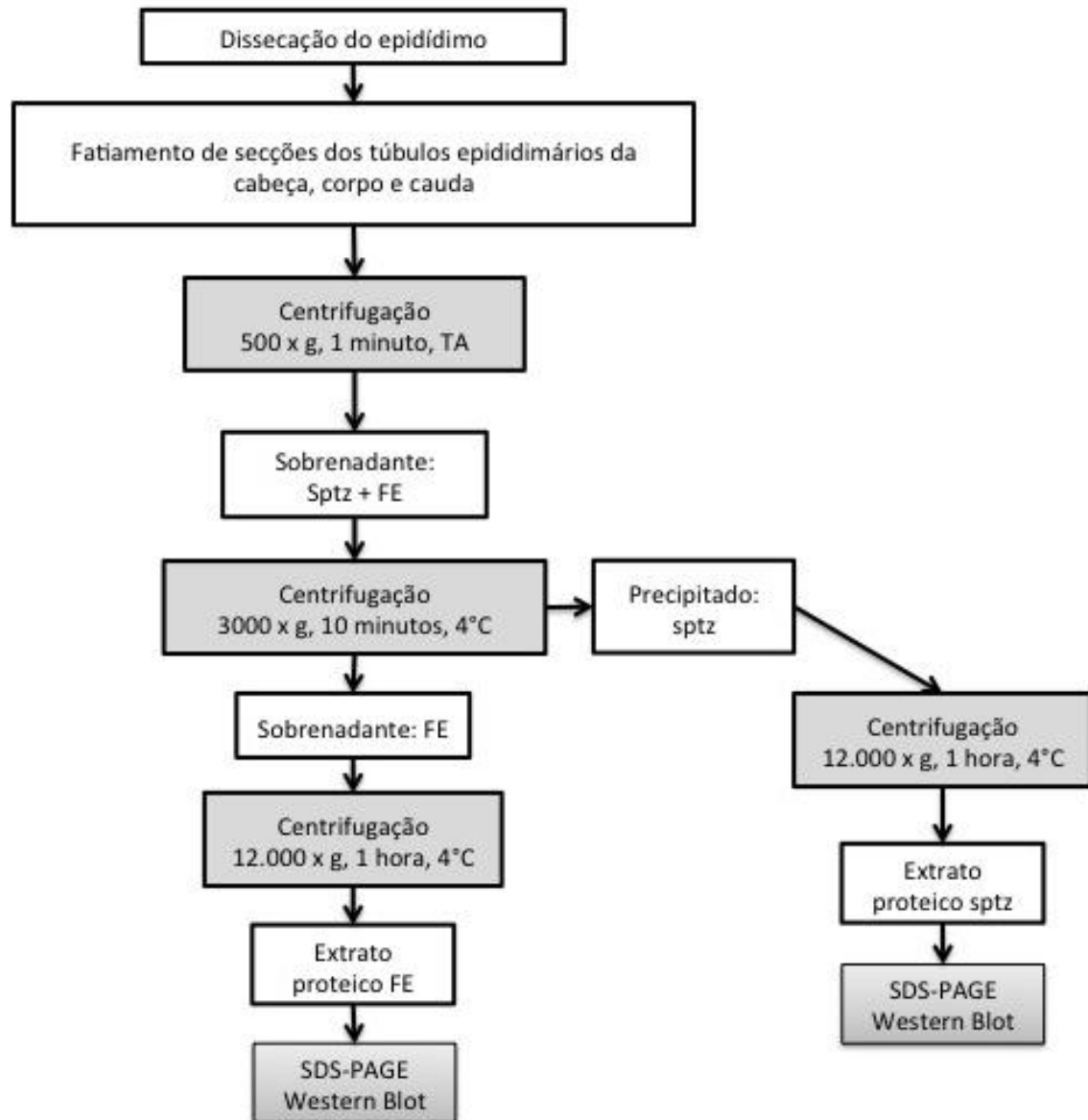
Fonte: Adaptado de Fàbrega *et al.*, 2011

As amostras foram centrifugadas a baixa rotação (500 x g, por 1 min em temperatura ambiente (TA) para separação de tecido e sobrenadante. O sobrenadante, contendo espermatozoides (sptz), fluido epididimário e PBS foi transferido para um novo tubo eppendorf sendo novamente centrifugado a 3000 x g, por 10 min a 4 ° C para sedimentação dos espermatozoides. O sobrenadante, contendo fluido epididimário e PBS foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 1h a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado com inibidor de proteases a – 80 ° C.

O precipitado de células foi ressuspendido em 300 µL de PBS com coquetel de inibidores de protease (Sigma). Para a produção de extrato proteico de espermatozoides, as amostras foram lisadas mecanicamente, em 10 movimentos com seringa de insulina em tampão de lise com tampão RIPA (0,3025 g de Tris 50 mM, 0,4383 g de NaCl 150 mM, 0,01861 g de EDTA 1 mM acrescido de 500 µl de Triton e 0,050 g de SDS), sendo novamente centrifugados a 12.000 x g por 1h a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado a – 80 ° C.

O fluxograma do protocolo de obtenção dos espermatozoides e fluidos epididimários está descrito na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma do protocolo de obtenção dos conteúdos epididimários utilizado neste trabalho.



Fonte: Da autora.

3.4 SDS-PAGE e Western blotting

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica como padrão. Para a eletroforese foram utilizados géis de poliacrilamida 10%, compostos de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 40% (39% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris 1,5 mM pH 8,8,

SDS 0,1%, 20 µL de persulfato de amônio 10% e 3 µL de TEMED, em volume total de 5 ml. O gel de entrada constituído por acrilamida 4,5%, bis acrilamida 0,1%, Tris 500 mM pH 6,8, SDS 0,1%, 27 µL de persulfato de amônio 10% e 2,5 µL de TEMED, em um volume total de 2,5 mL. A corrida foi feita com tampão Running buffer (1,44% de glicina, 0,3% de Tris e SDS 0,01%). Quantidades iguais de proteína (30 µg) de cada amostra foram diluídas em tampão Laemlli (Tris 1,562 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 7%, β-mercaptoetanol 12%, azul de bromofenol 0,25%) agitadas em vórtex e incubadas a 100°C por 5 minutos. Foram aplicados 16 µL de cada amostra no gel já submerso no tampão de corrida gelado. Utilizou-se o Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), alimentado por fonte de eletroforese nas condições: 80 V, 20 mA por gel.

Ao final da eletroforese, o gel de acrilamida com as proteínas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, Bilerica, EUA), ambos colocados entre papéis filtro Watman nº3, embebidos em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%). O sistema foi colocado em um cassete de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Após transferência, a membrana foi incubada com M-TPBS (tampão PBS, adicionado de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) por 60 minutos a fim de se obter o bloqueio de sítios não ocupados na mesma. Utilizou-se a programação padrão do aparelho para o número indicado de géis transferidos.

A imunodeteção das proteínas deu-se com a incubação do anticorpo primário específico (anti-PDI, anti-PDILT, anti-PDIA3, gentilmente cedidos pelo Dr. Adam M. Benham, da Durham University) por no mínimo, 6 horas sob refrigeração no homogeneizador. Após o período, o anticorpo primário foi retirado e a membrana lavada três vezes por 5 minutos com T-PBS. Foi feita nova incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato (Amershan Pharmacia), concentração 1:2000 diluído em M-TPBS por 2 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes com T-PBS. A actina foi usada como normalizador. Para tanto, foi empregado anticorpo anti-actina produzida em coelho (multi-espécie, Sigma) na concentração de 1:2000.

Para visualização das bandas, utilizou-se o Kit de ECL (Enhanced

Chemiluminescence - Millipore, Bilerica, EUA). Método que se baseia na ação da peroxidase (conjugada no anticorpo secundário) no luminol presente nos reagentes de ECL. O resultado é a liberação de fótons que marcarão filmes de raio-X, possibilitando a identificação de bandas. Os filmes de raio-X foram digitalizados em formato TIFF, e as bandas quantificadas pela utilização do software livre ImageJ.

3.5 Análise Estatística

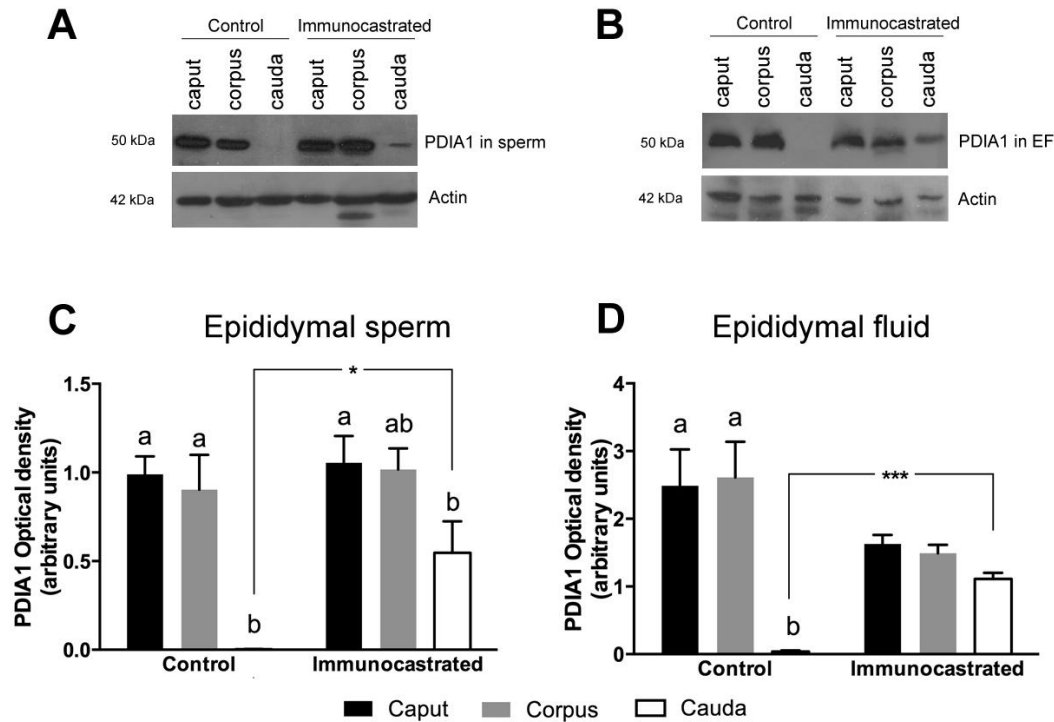
A quantificação dos geis permitiu a comparação da quantidade das proteínas entre os grupos, que foi realizada através do teste t de student, ou ANOVA e TUKEY, realizado com o software Prism 6 (GraphPad) adotando nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

No grupo controle, o imunoconteúdo da PDIA1 (figura 8C) foi semelhante nos espermatozoides obtidos da cabeça e corpo do epidídimo, não sendo detectada a proteína nas amostras da cauda ($P \leq 0,05$). Nos animais imunocastrados, os espermatozoides da cauda foram marcados com a PDIA1 em quantidade significativamente igual ao corpo, porém, menor que a cabeça ($P \leq 0,05$). Esta expressão foi ainda maior que a amostra da mesma região obtida dos animais controle ($P \leq 0,05$).

Na Figura 8D, observa-se que a PDIA1 está presente apenas no fluido da cabeça e corpo de animais controle. Por outro lado, nos animais imunocastrados, detectou-se a presença de PDIA1 no fluido da cauda na mesma quantidade das demais regiões, sendo esta quantidade superior nos imunocastrados em comparação ao grupo controle ($P \leq 0,001$).

Figura 8: Presença de PDIA1 em espermatozoides e fluido obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachos controle e imunocastrados. A e B: resultados de western blotting indicando as bandas referentes a PDIA1. C e D: imunoconteúdo de PDIA1 no espermatozoide e fluido epididimário, respectivamente. Letras e * acima das barras indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$). Sperm – espermatozoide; EF - fluido epididimário; control – grupo controle; imunocastrated – grupo imunocastrado.

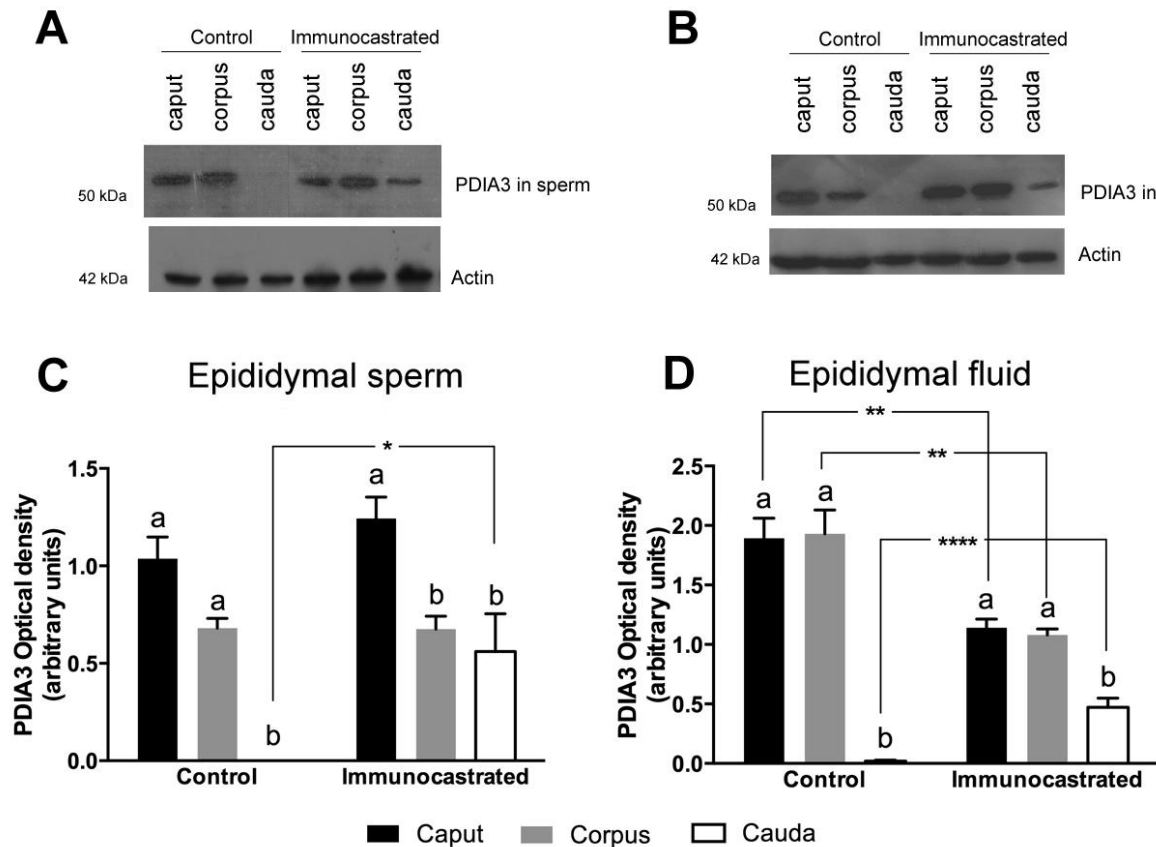


Fonte: Da autora

De forma semelhante a chaperona anterior, a quantificação da PDIA3 mostrou a mesma quantidade nos espermatozoides da cabeça e corpo dos animais controle, não sendo detectada nas células coletadas da cauda do epidídimo (Figura 9 C). No grupo imunocastrado, esta proteína foi encontrada em maior quantidade nos espermatozoides da cabeça do epidídimo em comparação com as outras regiões ($P \leq 0,05$). Semelhante a PDIA1, a PDIA3 foi detectada nas células espermáticas da cauda do epidídimo nos animais imunocastrados ($P \leq 0,05$).

A PDIA3 apresenta diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Figura 9). Observou-se uma menor quantidade desta chaperona no fluido da cabeça e corpo de animais imunocastrados ($P \leq 0,01$), porém o oposto foi observado com relação à média das amostras da cauda ($P \leq 0,0001$). Na análise dentro dos grupos, cabeça e corpo apresentaram maior imunoconteúdo de PDIA3 ($P \leq 0,05$).

Figura 9 - Presença de PDIA3 em espermatozoides e fluido obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachacos controle e imunocastrados. A e B: resultados de western blotting indicando as bandas referentes a PDIA3. C e D: imunoconteúdo de PDIA3 no espermatozoide e fluido epididimário, respectivamente. Letras e * acima das barras indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$). Sperm – espermatozoide; EF - fluido epididimário; control – grupo controle; imunocastrated – grupo imunocastrado.



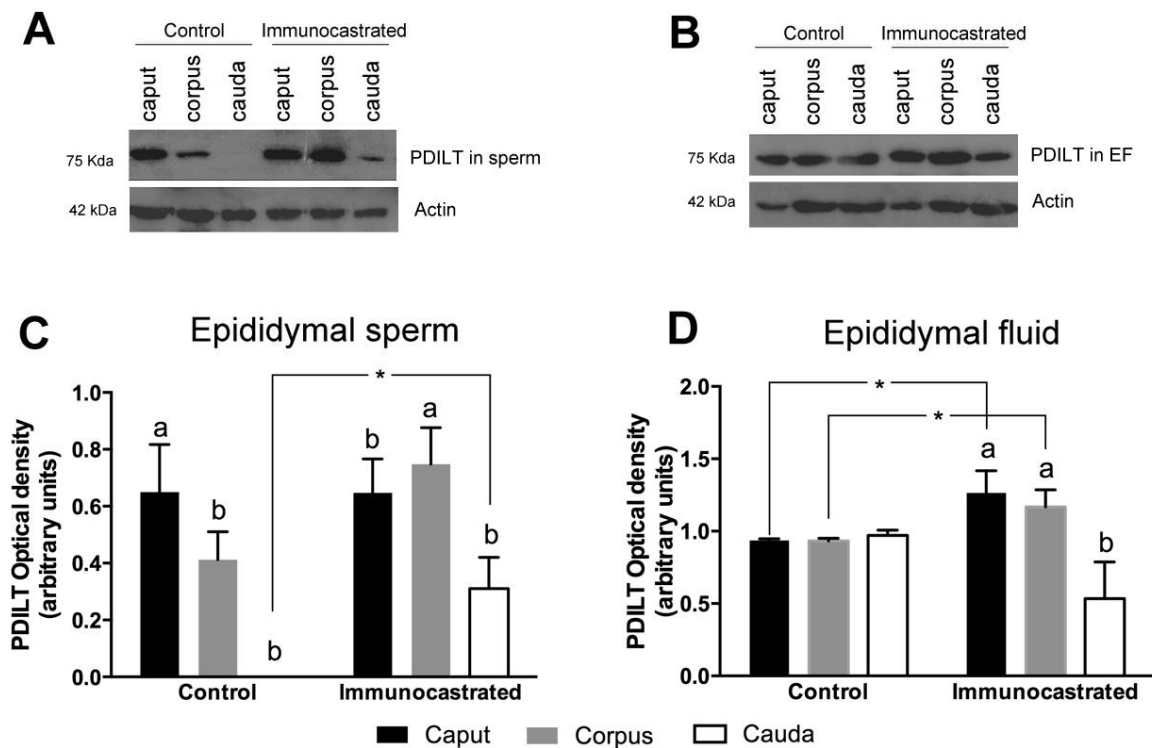
Fonte: Da autora

A PDILT apresentou algumas características distintas, quando comparadas as outras duas chaperonas descritas anteriormente. Nos animais controle, os espermatozoides da cabeça apresentaram maior quantidade de PDILT em comparação com as outras regiões do epidídimo ($P \leq 0,05$, Figura 10 C). Contudo, nos animais imunocastrados, os espermatozoides com maior imunoconteúdo de PDILT foram obtidos do corpo do epidídimo ($P \leq 0,05$). Os espermatozoides da cauda apresentaram quantidade significativamente maior de PDILT nos imunocastrados em relação ao controle. ($P \leq 0,05$, Figura 10C).

Diferente das outras PDI, a PDILT não apresentou diferença no fluido testicular obtido das diferentes regiões do epidídimo do grupo controle. Já nos animais imunocastrados, uma maior concentração foi identificada nas amostras de fluido da cabeça e corpo ($P \leq 0,05$) tanto em comparação com o fluido da cauda dos

imunocastrados, quanto com as mesmas regiões do grupo controle (Figura 10 C e D) ($P \leq 0,05$).

Figura 10 - Presença de PDILT em espermatozoides e fluido obtidos de diferentes regiões do epidídimo suíno, em cachos controle e imunocastrados. A e B: resultados de western blotting indicando as bandas referentes a PDILT. C e D: imunocntéudo de PDILT no espermatozoide e fluido epididimário, respectivamente. Letras e * acima das barras indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$). Sperm – espermatozoide; EF - fluido epididimário; control – grupo controle; immunocastrated – grupo imunocastrado.



Fonte: Da autora

5 DISCUSSÃO

Nesta dissertação verificou-se a influência da imunocastração com a vacina comercial Vivax[®] (Pfizer) no imunoconteúdo de chaperonas da família PDI no epidídimo suíno. Os resultados demonstraram uma evidente alteração da PDIA1, PDIA3 e PDILT tanto nos espermatozoides quanto nos fluidos, em especial na região da cauda nos animais imunocastrados.

As PDI possuem importantes papéis em diferentes tecidos modulando a conformação de diversas proteínas através da manipulação de suas pontes de dissulfeto. Ao oxidar, reduzir ou isomerizar as ligações entre resíduos de cisteína pode-se alterar (inibir, estimular, anular) as funções da proteína-alvo (BENHAM, 2013). Um exemplo desta modulação na fisiologia espermática é a conversão do dímero de hexoquinase isozima tipo 1 (HK1S) em monômeros, sendo esta conversão resultado da clivagem de pontes dissulfeto entre as subunidades. Como consequência, a atividade da hexoquinase aumenta, juntamente com a motilidade do espermatozoide (NAKAMURA *et al.*, 2008).

Com relação às diferenças entre as regiões do epidídimo, observou-se que as três PDI estudadas estavam sempre em maior quantidade nos espermatozoides obtidos da cabeça e corpo nos animais controle. Com exceção da PDILT, o mesmo padrão de distribuição foi observado no fluido epididimário. Este resultado sugere

que estas enzimas podem estar associadas a processos iniciais de maturação espermática.

A porção inicial do epidídimo é onde ocorre o primeiro contato dos espermatozoides com o fluido epididimário, em especial com as secreções das células epiteliais do epidídimo. O secretoma do epidídimo suíno mostra a intensa liberação de proteínas na luz epididimário, principalmente nas regiões proximais, sendo as proteínas RNase10, glutathione peroxidase (GPX), clusterin e hexosaminidase as mais abundantes (DACHEUX *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*, 2009). Algumas destas proteínas, porém, não permanecem no fluido epididimário, sendo reabsorvidas nas regiões subseqüentes (GUYONNETT *et al.*, 2011).

Como as PDI ainda não possuem seus mecanismos de ação totalmente elucidados, pode-se analisar sua influência nos fenômenos celulares através de suas interações com suas proteínas clientes (alvo). Estas podem ser membros de vias de sinalização ou proteínas efetoras de funções fisiológicas. Os dados disponíveis de proteômica e expressão gênica do epidídimo de diferentes espécies (BELLEANNÉ *et al.*, 2012, MOURA *et al.*, 2010; SYNTIN *et al.*, 1996, SYNTIN *et al.*, 1999) nos auxilia a estimar o papel desempenhado pelas PDI no controle de atividade e função de outras proteínas.

Dentre as proteínas que interagem com as PDI, pode-se destacar a clusterin, uma pequena glicoproteína constitutiva e predominantemente expressa em quase todos os tecidos em mamíferos, incluindo fluidos corpóreos como o sêmen (JONES; JOMARY, 2002). Primeiramente, foi identificada no testículo ovino como uma proteína termoestável, sensível a digestão por tripsina (FRITZ *et al.*, 1983). Hoje, porém, é considerada uma molécula multifuncional envolvida em variadas atividades como controle de ciclo celular, proliferação, interação célula-célula, reciclagem de membrana e apoptose (JONES; JOMARY, 2002; TROUGAKOS; GONOS, 2002).

A clusterina é produzida de duas formas principais: a clusterina secretória (sCLU), um heterodímero glicoproteico de 449 aa (76 a 80 kDa) ligado por pontes dissulfeto (Shannan *et al.*, 2006), presente no leite, líquido cerebrospinal, plasma sanguíneo, urina e sêmen (JONES; JOMARY, 2002; LESKOV *et al.*, 2003); e a clusterina nuclear (nCLU), isoforma resultado de um *splicing* alternativo com 49 kDa

que permanece dentro da célula, estando presente em tecidos como testículo adulto, ovário, fígado, coração e cérebro (SALEHI *et al.*, 2013). Curiosamente, a SCLU possui funções anti-apoptóticas, enquanto a nCLU age como fator pró-apoptótico (SALEHI *et al.*, 2013).

A associação entre a clusterin e a qualidade seminal foi verificada por Jobim *et al.* (2004) que correlacionou esta proteína a congelabilidade (crioresistência) do sêmen bovino. Já em homens férteis, a concentração de clusterin é maior que em indivíduos inférteis, estando os valores correlacionados negativamente com a deficiência de protaminas, fragmentação de DNA espermático e patologia espermática (SALEHI *et al.*, 2013). Tais características apontam a clusterin como um potencial marcador de qualidade seminal masculina. E, como sua atividade depende de sua conformação heterodimérica mantida por pontes dissulfeto, as PDI, especialmente PDIA3 (ERp57), podem estar diretamente associadas no controle de sua função.

Outro grupo de proteínas clientes das PDI são as ADAM (a disintegrin and metalloprotease). Expressas no testículo e ductos pós-testiculares (epidídimo e canal deferente) de diversos mamíferos (Moreno *et al.*, 2011), possuem um papel significativo na regulação da espermatogênese. Dentre as mais de 17 variedades descritas, dois membros desta família de metaloproteases interagem com a PDIA1 (ADAM17) e PDIA3 (ADAM10 e ADAM17) (MORENO *et al.*, 2011). Uma vez que o presente trabalho não pode determinar se as PDI avaliadas estavam sendo efetivamente secretadas pelo epitélio dos túbulos epididimário, deve-se considerar a possibilidade destas chaperonas serem oriundas do fluido testicular.

A exata interação entre as PDI e as ADAM ainda não são completamente compreendidas. Em um estudo de interação em modelo de cultura celular (HT1080 - fibrosarcoma humano) entre diversas PDI e seus substratos, observou-se que a PDIA3 (ERp57) é responsável pela formação de 7 pontes dissulfeto na ADAM17 e 3 na ADAM10 (JESSOP *et al.*, 2007; JESSOP *et al.*, 2009).

Willems *et al.* (2010) demonstraram o papel da PDIA1 (PDI) no controle da atividade da ADAM17. Os autores observaram que a inibição da atividade thiol isomerase da PDIA1 induz o aumento da atividade da ADAM17, e que a

isomerização de pontes dissulfeto da ADAM17 resulta na alteração da sua conformação com reflexos em sua atividade, alterando-a do formato ativo para o inativo. Estes resultados foram considerados promissores (comentário publicado por Bass; Edwards, 2010), pois possibilitam um novo entendimento e novas linhas de estudo no mecanismo de processamento (atividade *sheddase*) de ectodomínio pelas ADAM.

As proteínas ADAM possuem um mecanismo que regula a sinalização celular parácrina e autócrina, sendo esta realizada através da clivagem de ectodomínios de receptores e ligantes de membrana, processo conhecido como *shedding* (BLOBEL, 2005). A ADAM1 foi a primeira metaloprotease identificada e localizada no testículo, tendo hoje seu papel na fertilização compreendido. A nível celular, as ADAM estão envolvidas em pelo menos três etapas da fertilização: adesão do espermatozoide a zona pelúcida, adesão do espermatozoide a membrana plasmática do oócito, e fusão dos gametas (EVANS, 1999; TALBOT, 2003). Desde então, diversas ADAM foram descritas em diferentes tecidos, cumprindo diversas funções, atuando em vias de sinalização celular relacionadas à morte e inflamação (MORENO *et al.*, 2011).

A ADAM17, também conhecida como TACE (enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa) é uma protease chave no desenvolvimento de mamíferos (Evans, 1999), tendo como substrato o receptor de tirosina cinase c-kit. Este receptor (145 kDa) é uma proteína transmembrana glicosilada que quando ligada ao ligante (SCF, *stem cell factor*), inicia uma cascata de sinalização resultando em proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (BEDELL, 2004). A relação entre a atividade da ADAM17 e apoptose foi demonstrada em diferentes modelos celulares, incluindo cultura de mastócitos e células endoteliais de cordão umbilical (MATSUI, 2004). Esta relação ficou clara quando a indução da apoptose em células embrionárias por PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, um éster de forbol que ativa proteína cinase C) foi bloqueada em células com uma forma inativa mutante de TACE/ADAM17 (EVANS, 1999).

Igualmente, a ADAM10 possui atividade de processamento de pró-domínio (*shedding*) durante a espermatogênese e sua atividade também está associada a apoptose das células espermáticas (EVANS, 1999). Durante a espermatogênese,

dados experimentais apontam para o possível processamento (clivagem) do ligante de Fas (FasL) pela ADAM10, inibindo desta forma, a indução de apoptose das células germinativas via receptor Fas. Os autores propuseram ainda que apenas FasL associados a membrana, e não solúvel, induzem a sinalização via Fas (via extrínseca). Ressalta-se que a maquinaria apoptótica (ou seja, proteínas das vias de sinalização) é utilizada fisiologicamente nas células durante a espermatogênese para a formação dos gametas. Porém, a apoptose propriamente dita das células germinativas é induzida por níveis reduzidos de testosterona e FSH plasmáticos (revisado por BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2005). Aparentemente, qualquer alteração no controle da espermatogênese leva as células germinativas a entrar em apoptose (AITKEN; BAKER, 2011). O estágio da espermatogênese em que a apoptose ocorre predominantemente é nas espermatócitos em paquíteno, sendo o sistema Fas/FasL o provável mediador deste processo (LIN *et al.*, 2010).

Moreno *et al.* (2011) propõem um modelo para os papéis da ADAM10 e ADAM17 no controle da apoptose nas células germinativas. Indutores clássicos de apoptose como estresse oxidativo e dano ao DNA induzem, via p38, a ativação da ADAM17 associada a membrana das células espermáticas, que irá assim clivar o receptor c-Kit, que induz a ativação de caspase via p53 e Bax e BAK (localizados na mitocôndria).

Diferentemente, a ativação da ADAM10 promove a inibição da apoptose. Nas células de Sertoli, os autores propõem a ativação (por via desconhecida) da ADAM10, resultando no processamento do FasL na membrana desta célula, impedindo sua ligação ao Fas nas membranas das células germinativas. Assim, por ambas as vias intrínsecas e extrínsecas, as ADAM podem controlar o destino das células germinativas no testículo.

Cabe aqui ressaltar que a presença das três PDI nos espermatozoides dos cachos imunocastrados, ou seja, com níveis séricos de testosterona praticamente zero, pode ser uma consequência do processo apoptótico que se estabeleceu nos túbulos seminíferos destes animais. Apesar de, neste modelo suíno, a apoptose não ter sido descrita ou quantificada, sabe-se que em resposta a redução de FSH, LH e testosterona, as células de Sertoli induzem a apoptose nas células da linhagem espermatogênica (AITKEN; BAKER, 2013). Como a espermatogênese não cessa

por totalmente nestes animais, os espermatozoides produzidos devem possuir altas atividades de enzimas apoptóticas (ex. caspases). E pelo fato de as PDI estarem associadas ao disparo destas vias de sinalização, sua expressão pode estar também aumentada nas células germinativas pós-meióticas.

A ausência de PDIA1, PDIA3 e PDILT no espermatozoide da cauda do epidídimo aponta para a possível remoção destas proteínas do espermatozoide durante o trânsito epididimário. É possível considerar a hipótese de que isto ocorre, pois tais PDI não são mais necessárias nesta região, contudo não há dados na literatura que apontem para o mecanismo de remoção destas proteínas. As possíveis explicações são (i) a degradação destas por proteases do fluido epididimário, e (ii) a degradação proteica por proteassomos via rotas de ubiquitinação, já que dados de interactoma indicam a interação da PDIA1 com as ubiquilins UBQLN1 e UBQLN2.

O fenômeno de redistribuição e remoção de proteínas do espermatozoide ao longo do trânsito epididimário tem apenas um exemplo bem descrito. A gACE (gonad angiotensin-I converting enzyme) é totalmente removida do espermatozoide ainda na região da cabeça. Gatti *et al.* (1999) demonstraram que a gACE é alvo de proteólise e que o produto desta reação é liberado no fluido epididimário, interagindo com o epitélio do túbulos do epidídimo. Se as PDI sofrem fisiologicamente o mesmo processo ainda é um dado a ser confirmado.

A cauda do epidídimo é a região de estocagem de espermatozoides pré-ejaculação. Nesta região, os espermatozoides são mantidos com baixo metabolismo celular, diminuindo a produção de ERO e gasto de ATP (AITKEN; BAKER, 2006). A ausência fisiológica destas PDI nestes espermatozoides e fluido epididimário (exceto PDILT) pode ser explicada pelo fato de que os gametas já possuem as proteínas necessárias (e na conformação correta) para exercer as interações e atividades no trato reprodutivo feminino. Esta hipótese, apesar de ainda não comprovada, auxilia na explicação de presença das PDI na cauda dos animais imunocastrados.

De fato, a identificação das PDI nos espermatozoides e fluido obtidos da cauda do epidídimo dos animais imunocastrados foi a observação mais que significativa neste trabalho. Os dados, contudo, não permitem apontar as causas da

presença das três PDI na cauda dos animais imunocastrados. Todavia, algumas explicações podem ser consideradas.

Uma primeira hipótese é a quantidade significativamente maior de espermatozoides com gotas proximais (que se caracterizam por resíduos de citoplasma presos a peça intermediária do espermatozoide) no ejaculado de suínos imunocastrados em comparação com o controle ($78,1 \% \pm 6,27$ e $10,1 \% \pm 4,21$, respectivamente) (EINARSSON *et al.*, 2011). Isto ocorre em função da disfunção testicular causada pela redução da liberação de GnRH e consequentemente LH e FSH, e testosterona (Brunius *et al.*, 2011) e estradiol (E_2). Como consequência, as mitoses e meioses não ocorrem mais nas espermatogônias, espermátocitos primários e secundários, levando a um desarranjo na estrutura dos túbulos seminíferos. Assim, as poucas espermátides produzidas e que sofrem espermição, resultam na formação de espermatozoides com significativas alterações morfológicas. As gotas proximais, em sua maioria, são removidas durante o trânsito epididimário (revisto por Cooper, 2011), mas provavelmente devido à baixa concentração de testosterona e estradiol, este processo não é efetuado corretamente, resultando em células ejaculadas com altas taxas desse defeito. É razoável pensar que a gota proximal possua restos de vesículas do retículo endoplasmático (RE), reservatório natural das PDI. Contudo não há evidências até hoje de que as gotas proximais possuem restos de RE, apesar de apresentarem estruturas vesiculares e lamelares (saculares) com características de Golgi (OKO *et al.*, 1993). Estudos de co-localização por microscopia confocal utilizando anticorpos anti PDIs e marcadores específicos para RE podem elucidar esta questão.

Uma segunda possibilidade que explicaria a presença de PDIs em espermatozoides da cauda do epidídimo dos animais imunocastrados é a relação destas com hormônios. A interação da PDIA1 e da PDIp (isoforma pancreática) com $17\text{-}\beta$ -estradiol e diethylstilbestrol foi considerada maior que outras moléculas testadas, como aldosterona, progesterona e dexametasona, evidenciando a importância do grupo fenol livre dos estrógenos para a interação (IMAOKA, 2011). Devido a esta alta capacidade de ligação intracelular ao estradiol a PDIA1 provavelmente organiza um reservatório de estrogênio (E_2), modulando as atividades biológicas deste hormônio (PRIMM; GILBERT, 2001).

Buscando explicar a interação da PDIA1 e estradiol, Fu *et al.* (2009) propuseram que o reservatório intracelular de PDIA1-E₂ pode controlar o nível extracelular de E₂, quando houver a necessidade de compensar as flutuações em seus níveis plasmáticos. Os autores citam ainda que altas concentrações de PDIA1 podem auxiliar no acúmulo de E₂ dentro das células, permitindo uma ativação mais intensa dos receptores de estrogênio, o que não ocorreria em células com concentrações fisiológicas menores desta chaperona. No mesmo artigo, foi demonstrado que o estrogênio ligado a PDIA1 está protegido da inativação metabólica, viabilizando outro nível de controle da função estrogênica. Desta forma, a PDIA1 pode efetivamente modular os níveis intracelulares de estrogênio, alterando a magnitude e duração de atividade.

Utilizando este raciocínio na interpretação dos achados na presente pesquisa, é possível considerar que uma maior quantidade de PDI na cauda do epidídimo dos animais imunocastrados (tanto no fluido quanto nos espermatozoides), pode ser uma resposta tecidual ao baixo estradiol. Apesar de não ter sido quantificado no epidídimo, sabe-se que a imunocastração reduz em 10 vezes o nível sérico de estradiol (BRUNIUS *et al.*, 2011). Os efeitos desta redução hormonal significativa não são sentidos apenas nos parênquimas testicular e epididimário, mas também nos espermatozoides em maturação.

Os gametas masculinos de humanos e suínos são os únicos em que foram descritos receptores de estrógenos (ER α e ER β) (AQUILA *et al.* 2004; SOLAKIDI *et al.* 2005; RAGO *et al.* 2007). O efeito do estrogênio no espermatozoide suíno ocorre como uma rápida resposta na modulação do Ca²⁺ intracelular, induzindo a capacitação e reação acrossômica (DED *et al.*, 2010). Além dos receptores clássicos, recentemente foi identificado o receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER), confirmando a importância deste hormônio na fisiologia espermática. Assim, a possibilidade do aumento da expressão de PDIs para manter o controle estrogênico no epidídimo (isto é, da maturação epididimária) para a produção de espermatozoides aptos a fertilização é uma hipótese a ser avaliada em experimentos futuros.

Os resultados aqui apresentados e discutidos são inéditos, não apenas no

suíno, como também em outras espécies já que a PDILT tinha sido descrita apenas no testículo de roedores. Como característica de trabalho pioneiro, muitas questões ficam para serem respondidas, em especial como as PDI modulam a apoptose e a homeostase estrogênica no epidídimo.

É comum em trabalhos com proteínas seminais a busca por aquela molécula que possa ser utilizada como um marcador de qualidade seminal, função testicular ou potencial fecundante do ejaculado. A presente dissertação não permite apontar um possível marcador, mas a presença de PDILT, PDIA1 e PDA3 nos espermatozoides pré-ejaculatórios de suínos com hipogonadismo causado pela imunocastração é um dado promissor do possível uso clínico futuro destas chaperonas.

Disfunções testiculares em função do hipogonadismo é uma condição clínica associada a diversos casos de infertilidade em homens. Contudo, em animais de produção, em especial suínos, estes dados não estão disponíveis, pois exames hormonais não são rotina em centrais de inseminação artificial devido aos altos custos. Portanto, marcadores proteicos seminais que reflitam a qualidade da espermatogênese e maturação epididimária dos espermatozoides têm grande potencial biotecnológico, contribuindo tanto para a saúde humana quanto a produção de alimentos.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A presente pesquisa demonstrou que foi possível realizar a descrição da ocorrência das chaperonas PDIA1, PDIA3 e PDILT no fluido e espermatozoides de diferentes regiões do epidídimo de suínos castrados cirurgicamente e imunocastrados. Este dado torna-se relevante uma vez que as PDI possuem importantes funções fisiológicas descritas nos mais diversos tecidos modulando a conformação de diversas proteínas através da manipulação de suas pontes de dissulfeto. O entendimento dessas funções no processo de espermatogênese e maturação espermática no epidídimo é essencial para elucidar questões referentes aos fenômenos bioquímicos e morfológicos que regem a formação de um espermatozoide apto à fertilizar o oócito.

Foi possível verificar através da quantificação do conteúdo proteico das chaperonas PDIA1, PDIA3 e PDILT que o mesmo sofre evidente alteração devido a imunocastração com a vacina comercial Vivax[®] (Pfizer). Este resultado pode ser observado tanto nos fluidos quanto nos espermatozoides das regiões de cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Esse resultado apresentou-se ainda mais notório na região da cauda dos animais imunocastrados em relação ao grupo controle.

Apesar de se ter o entendimento sobre ínfimas funções das proteínas

dissulfeto isomerase, questões surgem acerca da modulação estabelecida pelas PDI em processos patológicos e fisiológicos, principalmente o processo de apoptose e a homeostase hormonal no epidídimo. Desta forma, a presente dissertação não permite alegar marcadores moleculares, porém, oferece dados promissores para uso clínico futuro destas chaperonas.

Uma das questões a serem respondidas é se existe efetivamente a expressão e secreção das PDI pelo epidídimo. Esta definição confirmaria a importância das PDI na maturação epididimária. Ainda, estudos de imunohistoquímica buscando descrever a presença das PDI nas células do epitélio epididimário e espermatozoides ao longo do trajeto epididimário podem nos auxiliar na compreensão da participação destas chaperonas na fisiologia reprodutiva masculina.

REFERÊNCIAS

ADACHI, T. et al. ADAM7 (A Disintegrin and Metalloprotease 7) mRNA Is Suppressed in Mouse Epididymis by Neonatal Exposure to Diethylstilbestrol. **Molecular reproduction and development**, v. 64, p. 414–421, 2003.

AITKEN, J. R.; BAKER, M. A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. **Int. J. Dev. Biol**, v. 57, p. 265-272, 2013.

AKAMA, K. et al. Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refoldin of reduced denatured lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1804, p. 1272-1284, 2010.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction. Lea & Febiger**, v. 76, p. 645-657, 1993.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v.7, p.145-173, 1987.

AQUILA, S.; SISCO, D.; GENTILE, M. E. et al. Estrogen receptor (ER) a and ERb are both expressed in human ejaculated sper-matozoa: evidence of their direct interaction with phosphati- dylinositol-3-OH kinase pathway. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, p. 1443–145, 2004.

BARBOUCHE, R.; MIQUELIS, R.; JONES, I. M.; FENOUILLET, E. Protein-disulfide isomerase mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 3131-3136, 2003.

BARROS, G. S. C. et al. Agronegócio brasileiro: perspectivas, desafios e uma agenda para seu desenvolvimento. Documento do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Piracicaba. CEPEAESALQ/USP, 2006.

BASS, R.; EDWARDS, D.R. ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding? Cellular Protease Group, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, U.K. **Biochem. J.**, v. 429, p. 3–5, 2010.

BEDELL, M. A.; MAHAKALI, A.; ZAMA , A. Genetic analysis of Kit ligand functions during mouse spermatogenesis. **J Androl.**, v. 25, p. 188–199, 2004.

BELLEANNÉE, C. et al. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. **Syst Biol Reprod Med.**, v. 58, n. 4, p. 197-210, 2012.

BENHAM, A. M. Protein **Secretion and the Endoplasmic Reticulum. Cold Spring Harb Perspect Biol.**, doi: 10.1101/cshperspect.a012872, 2013.

BENHAM, A. M. The protein disulfide isomerase family: Key players in health and disease. **Antiox. Redox. Signal.**, v. 16, p. 781-789, 2012.

BENNETT, T. A.; EDWARDS, B. S.; SKLAR, L. A.; ROGEL, J. S. Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation independent L-selectin shedding from leukocytes. **J. Immunol.**, v. 164, n. 8, p. 4120-4129, 2000.

BERNAL, G.; CASARIN, A.; HODGE, A.; HENNESSY, D. The performance of growth and carcass quality in male pigs receiving the vaccine contro sexual odor improvement compared with surgically castrated. **Proceedings**. 20 Cong Int Pig Vet Soc. Copenhagen, Dinamarca, 2006.

BLOBEL, C. P. ADAMs: key components in EGFR signaling and development. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 32-43, 2005.

BORK, K.; CHEVRIER, C.; PAQUIGNON, M.; JOUANNET, P.; DACHEUX, J. L. Analyse de la motilité et du mouvement flagellaire des spermatozoïdes de verrat au cours du transit epididymaire. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 28, p. 1307-1315, 1988.

BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYER-HOSKEN, R. A. Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Estatística da Produção e Pecuária**, 2013-01. p.13. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm>>. Acesso em: 17.11. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Suínos - mercado interno**. Brasília, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>. Acesso em: 19 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Suínos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, n. 172, p. 13-22, Seção I. 20 set. 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suínos>> Acesso em: 17 de nov. 2013.

BRAUNDMEIER, AG; MILLER, DJ. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **J. Dairy Sci.** v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BRUNIUS, C. et al. Early immunocastration of male pigs with Improvac® - effect on boar taint, hormones and reproductive organs. **Vaccine**, v. 29, n. 51, p.9514-9520, 2011.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C. Clonagem, expressão e purificação das proteínas do plasma seminal bovino relacionadas a alta congelabilidade do sêmen. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; JOBIM, M. I.; TREIN, C. WALD, V. B.; GREGORY,

M.; MATTOS, R. C. Equine seminal plasma proteins related with fertility. **Anim Reprod Sci.**, v. 89, p. 305-308, 2005.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 454-460, 1999.

CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2013 update. **Oxford Journals**. V. 41, p. 816-823, 2013.

CHO, J.; FURIE B. C.; COUGHLIN S. R.; FURIE, B. A critical role for extracellular protein disulfite isomerase during thrombus formation in mice. **J Clin Invest**, v. 118, p. 1123-1131, 2008.

CLARKE, I. et al. Related food safety of a hormone (GnRH) vaccine synthetic gonadotropin releasing to control boar taint in entire male pigs. Intern. **Journal App Res Vet Med.**, v. 6, p. 7-14, 2008.

COE, H.; JUNG, J.; GROENENDYK, J.; PRINS, D.; MICHALAK, M. ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. The **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6725-6738, 2010.

COE, H.; MICHALAK, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. General physiology and biophysics, 28 Spec No Focus. **Journal Article**, v. 96, n. 103, 2009.

COHEN, F. E.; KELLY, J. W. **Nature Medicine**. v. 426, p. 905-909, 2003.

COOKE, H. J.; SOUNDERS, P. T. K. Germ cell transplantation— a fertile field. **Nature Medicine**, New York, v. 6, n. 1, p. 16-17, 2000.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian J Androl.**, v. 13, n. 1, p. 130–138, 2011.

COSTA, D. S.; HENRY, M.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese de catetos (Tayassu tajacu). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 46-51, 2004.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, v. 4, n. 1-2, p. 53-72, 2003.

COSTA, T. V. M. et al. A competitividade da suinocultura da região da produção/RS através da análise do *cluster* agroindustrial. **Teoria e Evidência Econômica**, v. 9, n. 17, p. 97-122, 2001.

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, L. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 6, p. 319–334, 2005.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, v. 54 , p. 151-168, 2002.

DACHEUX, J. L.; O'SHEA, T.; PAQUIGNON, M. Effects of osmolality, bicarbonate

and buffer on the metabolism and motility of testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa of boars. **J. Reprod. Fertil**, v. 55, n. 287–296, 1979.

DACHEUX, J.L. et al. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1-2, p. 45-50, 2009.

DAVISON, S.L. Hypoactive sexual desire disorder. **Curr Opin Obstet Gynecol**. v. 24, p. 215-220, 2012.

DED, L.; DOSTALOVA, P.; DOROSH, A. et al. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. **Reprod Biol Endocrinol**. v. 8, p. 87, 2010.

DIAS, A. A. S.; Papel da proteína dissulfeto isomerase na reatividade vascular à angiotensina II e noradrenalina: envolvimento da NADPH oxidase. São Paulo SP, 2011.

EBRAHIMIAN, T.; TOUYZ, R. M. **Thioredoxin** in vascular biology: role in hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 6, p. 1127-1136, 2008.

EDWARDS, D.R; HANDSLEY, M.M; PENNINGTON, C.J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med**. v. 29, p. 258–289, 2009.

EINARSSON, S. et al. Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 50-55, 2011.

EVANS J. P. Sperm disintegrins, egg integrins and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. **Front Biosci.**, v. 4, p. 114–131, 1999.

FÀBREGA, A. et al. Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (*Sus domesticus*) spermatozoa during epididymal maturation. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 9 n. 96, 2011.

FÀBREGA, A.; PUIGMULÉ, M.; BONET, S.; PINART, E. Epididymal maturation and ejaculation are key events for further *in vitro* capacitation of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, p. 867–877, 2012.

FISCHER J. S. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. **Reproduction**, v. 127, p. 305-315, 2004.

FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; J. L. Glutathion- independent prostaglandin D synthase in ram allio epididymal fluids; origin and regulation. **Bio logy of Reproduction**, v. 5 p. 558-566, 1999.

FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S. DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324-1336, 2008.

FRAIETTA, R.; ZYLBERSTEJN, D. S.; ESTEVES, S.C. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. **Clinics**, v. 68, p. 81-8, 2013.

FRITZ, I. B.; BURDZY.; SETCHELL, B.; BLASCHUK, O. Ram rete testis fluid

contains a protein (clusterin) which influences cell cell interactions in vitro. **Biol Reprod**, v. 28 p. 1173- 1188, 1983.

FU, X. M.; ZHU, B. T. Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDip) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 115, n. 1-2, p. 20-29, 2009.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1999.

GATTI, J. L.; DRUART, X.; GUERIN, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE) evidence that sperm are the source of this ACE. **Biol. Reprod.** V. 60, p. 937–945, 1999.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, M. G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p 826-833, 1998.

GIROUARD, J.; FRENETT, G.; SULLIVAN, R. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. **Biol Reprod.**, v. 80, n. 5, p. 965-972, 2009.

GRAVEN, K. K.; MOLVAR, C.; RONCARATI, J. S.; KLAHN, B. D.; LOWREY, S.; FARBER, H. W. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 282, n. 5, p. 996-1003, 2002.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 411-416, 1998.

GUYONNET, B.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L. The Epididymal Transcriptome and Review Proteome Provide Some Insights Into New Epididymal Regulations. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, 2011.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 7. ed., Barueri-SP: Manole, 513 p, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 6. ed. São Paulo: Manole, p. 59-94, 1995.

HERMO, L.; BARIN, K.; ROBAIRE, B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. **Anat. Rec.**, v. 233, p. 205–228, 1992.

HESS, R. A. et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**. v, 4, p. 509-12, 1997.

HINTON, B. T. et al. How Do You Get Six Meters of Review Epididymis Inside a

Human Scrotum? **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, 2011.

HUNNICUTT, G. R.; KOPPEL, D. E.; MYLES, D. G. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. **DEV BIOL.** v. 191, p. 146–159, 1997.

IKAWA, M.; KEIZO, T.; RYO, Y.; BENHAM, A. M. Casperin is a testis-specific chaperon required for sperm fertility. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 5639-5646, 2011.

IMAOKA, S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. **International review of cell and molecular biology**, v. 290, p. 121-166, 2011.

JAAKKOLA, U. Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo. **J. Reprod. Fertil.**, v. 68, p. 465–470, 1983.

JAAKKOLA, U.; TALO, A. Relation of electrical activity to luminal transport in the cauda epididymidis of the rat in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 64, p. 121–126, 1982.

JESSOP, C. E.; CHAKRAVARTHI, S.; GARBI, G.; HAMMERLING, G. J.; LOVELL, S.; BULLEID, N. J. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 1, p. 28-40, 2007.

JESSOP, C. E.; WATKINS, R. H.; SIMMONS, J. J.; TASAB, M.; BULLEID, N. J. Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 122, p. 4287-4295, 2009.

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, A. P.; MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 7, p. 2053-2062, 2004.

JOBIM, M. I.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 1, p. 765-761, 2011.

JOCELYN, H. D.; SETCHELL, B. P. A treatise concerning the generative organs of men. An annotated translation of "Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus". **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 17, p. 1–76, 1968.

JOHNSON, L.; THOMPSON JR.; D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 23–51, 2008.

JONES, S. E.; JOMARY, C. Clusterin. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 34, n. 5, p. 427-31, 2002.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 49, p.1202-1207, 1994.

KIM, E.; NISHIMURA, H.; IWASE, S.; YAMAGATA, K.; KASHIWABARA, S.; BABA, T. Synthesis, processing and subcellular localization of mouse ADAM3 during

spermatogenesis and epididymal sperm transport. **J Reprod Dev.** V. 50, p. 571–578, 2004.

KOZLOV, G.; MAATTANEN, P.; THOMAS, D. Y.; Gehring, K. A structural overview of the PDI family of proteins. **The FEBS journal**, v. 277, n. 19, p. 3924-3936, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.

LAMBERSON, W. R.; SAFRANSKI, T. J. A model for economic comparison of swine insemination programs. **Theriogenology**, v.15, p. 799-807, 2000.

LAURINDO, F. R.; FERNANDES, D. C.; AMANSO, A. M.; LOPES, L. R.; SANTOS, C. X. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. **Antioxid redox signal**, v. 10, n. 6, p. 1101 – 1113, 2008.

LESKOV, K. S.; KLOKOV, D.; LI, J.; KINSELLA, T. J.; BOOTHMAN, D. A. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 11590-11600, 2003.

LIN, Y. C.; YAO, P. L.; RICHBURG, J. H. FasL gene-deficient mice display a limited disruption in spermatogenesis and inhibition of mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced germ cell apoptosis. **Toxicol Sci.**, v. 114, p. 335–345, 2010.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, W. J.; FARR, A. L; Randall, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J Biol chem.**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUZ, N. B. L. P. O desempenho dos produtores de suínos em uma cooperativa da região centro oriental do Rio Grande do Sul: um estudo exploratório. 108 f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MANEELY, R. B. Epididymal structure and function: a historical and critical review. **Acta Zool.**, v. 40, p. 1–21, 1959.

MANELLA C. A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. Anatomia e fisiologia. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1072., 2009.

MATSUI, J.; WAKABAYASHI, T.; ASADA, M.; YOSHIMATSU, K.; OKADA, M. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. **J. Biol Chem.** v. 279, p. 18600–18607, 2004.

MCKEITH, F. K.; SOUZA, S. M.; BOLER, D. D.; KILLEFER, J.; HENNESSY, D. Implicações do uso VIVAX pelo odor sexual, crescimento, qualidade de carcaça e qualidade da carne de suínos em terminação masculinos. Universidade de Illinois em Urbana-Champaign e Zoetis, 2009.

McLACHLAN, R. I. Approach to the patient with oligozoospermia. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 98, p. 873-880, 2013.

MEISTRICH, M. L.; TROSTLE, P. K.; BROCK, W. A. Association of nucleoprotein transitions with chromatin changes during rat spermatogenesis. In: Jagiello; Vogel (Eds.), *Bioregulators of Reproduction*, Academic Press, New York, p. 151–166, 1981.

MIELE, M.; GIROTTI, A. F. A suinocultura brasileira em 2007 e cenário para 2008. **Suinocultura Industrial**, v. 211, n. 31 p. 14-22. 2008.

MIELE, M.; WAQUIL, P. D. Estrutura e dinâmica dos contratos na suinocultura de Santa Catarina: um estudo de casos múltiplos. **Revista Estudos Econômicos**, v. 37, n. 4, p. 817-847, 2007.

MIKAMI, T. et al. Alterations in the enzyme activity and protein contents of protein disulfide isomerase in rat tissues during fasting and refeeding. **Metabolism**, v. 47, n. 9, p. 1083-1088, 1998.

MOCARELLI, P.; BRAMBILLA, P. M.; GERTHOUS, D. G.; PATTERSON, N. Change in sex ratio with exposure to dioxin. **Lancet**, v.7, p. 348- 409, 1996.

MORAES, C. et al. Série em Biologia Celular e Molecular – Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro. 83 p., 2013.

MORENO, R. D.; URRIOLOA, M. P.; LAGOS, C. R. The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 3, p. 195–208, 2011.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte -penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 74, p. 214-222, 2007.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 98, p.169-188, 2007.

MOURA, A. A.; ERICKSON, B. H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cell in yearling beef bulls. **J. Reprod. Fertility**, v. 111, p. 183-190, 1997.

MOURA, A. A.; KOCK, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 98, p. 169-188, 2007.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J.

Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **J Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, 2010.

MURGAS, L. D. S. Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleos de soja como fonte de ácidos graxos. Lavras, 1999. 111 f. Tese (Doutorado em Nutrição de Monogástricos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.

NAKAMURA, N.; MIRANDA-VIZUETE, A.; MIKI, K.; MORI, C.; EDDY, E. M. Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. **Biology of reproduction**, v. 79, p. 537–545, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, E. S. Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogenico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*). 2001. 135p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2001.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 10, n. 5, p. 48-93, 1999.

OKO, R.; HERMO, L.; CHAN, P. TK.; FAZEL, A.; BERGERON, J. J. M. The Cytoplasmic Droplet of Rat Epididymal Spermatozoa Contains Saccular Elements with Golgi Characteristics. **The Journal of Cell Biology.**, v. 123, n. 4, 809-821, 1993.

OLIVA, R.; MATEO, S.; JOSEP, M. E. Sperm cell proteomics. **Proteomics.**, v. 9, p. 1004-1017, 2009.

OLIVEIRA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Epididymal biology: spermatogenic maturation and gene expression. **The word of health**, v. 33, n. 4, p.419-425, 2009.

ORGBIN-CRIST, M. C. Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme du taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys**, v. 2, p. 51–108, 2008.

ORGBIN-CRIST, M.- C. The epididymis across 24 centuries. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 53, p. 285–292, 1998.

OZCAN, U.; YILMAZ, E.; OZCAN, L. et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. V. 313, p. 1137-1140, 2006.

PASQUALOTTO, F. F.; LOCAMBO, C. V.; ATHAYDE, K. S.; ARAP, S. Measuring male infertility: epidemiological aspects. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med.**, v. 58, n. 3, p. 173-178, 2003.

PINEDA, M. H.; KAINER, R. A.; FAULKNER, L. C. Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 1487-1491, 1989.

PRIMM, T. P.; GILBERT, H. F. Hormone binding by protein disulfide isomerase, a high capacity hormone reservoir of the endoplasmic reticulum, **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 281–286, 2001.

RAGO, V.; AQUILA, S.; PANZA, R. et al. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. **Reprod Biol Endocrinol.** v. 5, p. 23, 2007.

REINHARDT, C. et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. **J Clin Invest**, v. 118, p. 1110 – 1122, 2008.

RIEMER, J.; BULLEID, N.; HERMANN, J. M. Dissulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. **Science**, v. 324 n. 5932, p.1284-1287, 2009.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 999–1080. Raven Press, New York, 2006.

ROBERTS, K. P. What are the components of the male reproductive system? In: *The American Society of Andrology, editor. Handbook of andrology.* Lawrence: Allen Press;. p. 1–5, 2010.

SALEHI, M. et al. Correlation Between Human Clusterin in Seminal Plasma With Sperm Protamine Deficiency and DNA Fragmentation. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 718– 724, 2013.

SANTOS, P. R. S et al. Caracterização morfológica e frequência dos estágios do ciclo do epitélio seminífero em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) criados em cativeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n.1, p.18-24, 2011.

SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. **J. Reprod. Fertility**, v. 111, p. 183-1902, 2003.

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Germ Cells and Fertilization**, v. 7, p. 63-101. 1993.

SHANNAN, B.; SEIFERT, M.; BOOTHMAN, D. A.; TILGEN, W.; REICHRATH, J. Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. **J Mol Histol.**, v. 37 n. 5-7, p.183-188, 2006.

SHARPE, R. Falling sperm counts in men – Is there an endocrine cause? **Journal of Endocrinology**, v. 137, p. 357-360, 1993.

SHARPE, R.; SKAKKEBAEK, N. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SILVEIRA, E. T. F. S. et al. IMPROVAC immunized male pigs compared to surgical castrates: control of boar taint and growth performance. **Proceedings.20th Cong Int Pig Vet Soc.**; Copenhagen, Dinamarca. Julho 2006.

SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Spermatogenesis. **Nature**, v. 426, p. 891-894, 2003.

SLUTSKY, M.; LEVIN, J.; LEVY, B. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 5, p.116-122, 1999.

SOLAKIDI, S.; PSARRA, A. M.; NIKOLAROPOULOS, S. et al. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and andro- gen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. **Hum Reprod.** v. 20, p. 3481–3487, 2005.

STRZEZEK, R.; FRASER, L. Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. **Reprod Biol.**, v. 9, p. 113-26, 2009.

SULLIVAN, D.C. et al. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 47, p. 47079-47088, 2003.

SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. **Am. J. Anat.**, v. 154, p. 27–55, 1979.

SUNDHEY, R.; AHUJA, T. S. P.; SINGHB, B. Changes in the membrane proteins of buck (*Capra hircus*) spermatozoa during epididymal maturation Small Rum. **Nature**, v. 16, p.251-261, 1995.

SÜPTITZ, L. A. S; WOBERTO, M. C. R; HOFER, E. Gestão de custos na suinocultura: um estudo de caso. **Custos e agronegócio on line** , v. 5, n. 1, p.1808-2882, 2009.

SWAN, H. S.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data, 1997.

SYNTIN, P. et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biol Reprod.**, v. 55, n. 5, p. 956-974, 1996.

SYNTIN, P.; DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. **Biol Reprod.**, v. 61, n. 6, p.1622-1635, 1999.

TAGER, M.; KRONING, H.; THIEL, U.; ANSORGE, S. Membrane bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. **Exp Hematol.**, v. 25, n. 7, p.601-607, 1997.

TAKANO, H.; ABE, K.; ITO, T. Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies. **Kaibogaku Zasshi**, v. 56, p. 79–90, 1981.

TALAMINI, E.; FERREIRA, G. M. V. Mercado internacional da carne suína: variáveis

que influenciam no número de países importadores. UPF – Faculdade de Ciências Econômicas: Texto para discussão n. 3, 2006.

TALBOT P.; SHUR, B. D.; MYLES, D. G. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions and sperm-egg fusion. **Biol Reprod.**, v. 68, p. 1–9, 2003.

TANAKA, S.; UEHARA, T.; NOMURA, Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. **J Biol Chem.** v. 275, n. 14, p. 10388-10393, 2000.

TEIXEIRA, C. A. V. Estudo dos parâmetros espermáticos e das proteínas seminais de caprinos da raça anglo-nubiana no nordeste do Brasil. Sobral Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. UVA EMBRAPA CAPRINOS 2008. Disponível em : <<http://www.embrapa.br/home>>. Acesso em: out. 2014.

TOURNADE, A. Différence de motilité des spermatozoïdes prélevés dans les divers segments de l'épididyme. **C. R. Soc. Biol.**, v. 74, p. 738–739, 2004.

TROUGAKOS, I. P.; GONOS, E. S. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 34, p. 1430- 1448, 2002.

TURANO, C.; COPPARI, S.; ALTIERI, F.; FERRARO, A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. **J Cell Physiol.**, v. 193, n.2, p. 154-163, 2002.

TURANO, C.; GAUCCI, E.; GRILLO, C.; CHICHIARELLI, S. ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. **Cell Mol Biol Lett.** v. 16, p. 539-63, 2011.

TURNER, T. T.; GLEAVY, J. L.; HARRIS, J. M. Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. **J. Androl.**, v. 11, p. 422–428, 1990.

UEHARA, T.; NAKAMURA, T.; YAO, D. et al. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature.** V. 441, p. 513-517, 2006.

VAN LITH, M. et al. A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells. **Mol. Biol. of the Cell.**, v. 18, p. 2795-2804, 2007.

VAN LITH, M.; HARTIGAN, N.; HATCH, J.; BENHAM, A. M. PDILT, a divergent testis-specific protein disulfide isomerase with a non-classical SXXC motif that engages in disulfide-dependent interactions in the endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 1376-1383, 2005.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

VILLWOCK, L. H. de M. Consórcios agroexportadores: estratégia para o desenvolvimento competitivo da cadeia de produção de suínos no Rio Grande do

Sul. **REAd**, v. 9, n. 4, 2003.

WATSON, PF; BEHAN, JR. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**. v. 57, p. 1683-1693, 2002.

WHITTEN, P. L. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. **Adv Mod Environmental Toxicology**, v. 21, p. 311- 320, 1992.

WHORTON, D.; KRAUSS, R.; MARSHALL, S.; MILBY, T. Infertility in male pesticide workers. **Lancet**, v. 2, p.1259-1260, 1977.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 15, p. 35-44, 2004.

WILLEMS, S. H. et al. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. **V**. 428, p. 439–450, 2010.

WILLEMS, S. H. et al. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. **Biochem. J**. v. 429, p. 439–450, 2010.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York, p. 189-317, 1994.

YEUNG, C. H.; COOPER, T. G. Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The epididymis – from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; p. 417–34, 2002.

ZHANG, J.; WU, J.; et al. Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 13, p. 663-639, 2007.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Seminars in cell & developmental biology** , v. 9, n. 4, p. 417-421, 1998.

APÊNDICE A – Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Quadro 1- A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4,641	0,2292	ns	No	
Group	6,012	0,0541	ns	No	
Epididymal region	46,04	< 0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,4187	2	0,2093	F (2, 32) = 1,543	P = 0,2292
Group	0,5423	1	0,5423	F (1, 32) = 3,998	P = 0,0541
Epididymal region	4,153	2	2,077	F (2, 32) = 15,31	P < 0,0001
Residual	4,341	32	0,1357		
Number of missing values			4		

Fonte: Da autora

Quadro 1- B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Number of families		2						
Number of comparisons per family		3						
Alpha		0,05						
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,		Significant?	Summary			
Control								
Caput vs. Corpus	0,08567	-0,4369 to 0,6082		No	ns			
Caput vs. Cauda	0,9867	0,4387 to 1,535		Yes	***			
Corpus vs. Cauda	0,9011	0,3530 to 1,449		Yes	***			
Immunocastrated								
Caput vs. Corpus	0,03757	-0,4462 to 0,5214		No	ns			
Caput vs. Cauda	0,5083	0,02449 to 0,9921		Yes	*			
Corpus vs. Cauda	0,4707	-0,01308 to 0,9545		No	ns			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control								
Caput vs. Corpus	0,9893	0,9037	0,08567	0,2127	6	6	0,5697	32
Caput vs. Cauda	0,9893	0,0026	0,9867	0,223	6	5	6,257	32
Corpus vs. Cauda	0,9037	0,0026	0,9011	0,223	6	5	5,714	32
Immunocastrated								
Caput vs. Corpus	1,055	1,017	0,03757	0,1969	7	7	0,2699	32
Caput vs. Cauda	1,055	0,5463	0,5083	0,1969	7	7	3,651	32
Corpus vs. Cauda	1,017	0,5463	0,4707	0,1969	7	7	3,381	32

Fonte: Da autora

Quadro 1- C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Table Analyzed	Sptz PDIA1 Caput	Sptz PDIA1 Corpus	Sptz PDIA1 Cauda
Column B	Immunocastrated	Immunocastrated	Immunocastrated
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	Control	Control	Control
Unpaired t test			
P value	0,7358	0,6192	0,0292
P value summary	ns	ns	*
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0,3461 df=11	t=0,5114 df=11	t=2,544 df=10
How big is the difference?			
Mean \pm SEM of column A	0,9893 \pm 0,1017 N=6	0,9037 \pm 0,1960 N=6	0,0026 \pm 0,001166 N=5
Mean \pm SEM of column B	1,055 \pm 0,1506 N=7	1,017 \pm 0,1188 N=7	0,5463 \pm 0,1781 N=7
Difference between means	0,06524 \pm 0,1885	0,1133 \pm 0,2216	0,5437 \pm 0,2138
95% confidence interval	-0,3497 to 0,4801	-0,3744 to 0,6011	0,06741 to 1,020
R squared	0,01077	0,02322	0,3928
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	2,558, 6, 5	2,331, 5, 6	32663, 6, 4
P value	0,3217	0,3322	< 0,0001
P value summary	ns	ns	****
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	Yes

Fonte: Da autora

APÊNDICE B – Análise estatística da quantificação de PDIA3 (Software Prism 6)

Quadro 2- A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	6,171	0,0695	ns	No	
Row Factor	7,484	0,0123	*	Yes	
Column Factor	56,65	< 0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,4963	2	0,2481	F (2, 32) = 2,901	P = 0,0695
Row Factor	0,6019	1	0,6019	F (1, 32) = 7,038	P = 0,0123
Column Factor	4,556	2	2,278	F (2, 32) = 26,64	P < 0,0001
Residual	2,737	32	0,08552		
Number of missing values		4			

Fonte: Da autora

Quadro 2- B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Number of families		2		
Number of comparisons per family		3		
Alpha		0,05		
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control				
Caput vs. Corpus	0,3563	-0,05857 to 0,7712	No	ns
Caput vs. Cauda	1,037	0,6018 to 1,472	Yes	****
Corpus vs. Cauda	0,6807	0,2455 to 1,116	Yes	**
Immunocastrated				
Caput vs. Corpus	0,5667	0,1826 to 0,9508	Yes	**
Caput vs. Cauda	0,6824	0,2983 to 1,067	Yes	***
Corpus vs. Cauda	0,1157	-0,2684 to 0,4998	No	ns

Fonte: Da autora

Quadro 2- C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control								
Caput vs. Corpus	1,037	0,6807	0,3563	0,1688	6	6	2,985	32
Caput vs. Cauda	1,037	0	1,037	0,1771	6	5	8,282	32
Corpus vs. Cauda	0,6807	0	0,6807	0,1771	6	5	5,436	32
Immunocastrated								
Caput vs. Corpus	1,243	0,6759	0,5667	0,1563	7	7	5,127	32
Caput vs. Cauda	1,243	0,5601	0,6824	0,1563	7	7	6,174	32
Corpus vs. Cauda	0,6759	0,5601	0,1157	0,1563	7	7	1,047	32

Fonte: Da autora

Quadro 2- D: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Table Analyzed	Sptz ERp57 Caput	Sptz ERp57 Corpus	Sptz ERp57 Cauda
Column B	Immunocastrated	Immunocastrated	Immunocastrated
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	Control	Control	Control
Unpaired t test			
P value	0,2208	0,956	0,0373
P value summary	ns	ns	*
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1,298 df=11	t=0,05650 df=11	t=2,401 df=10
How big is the difference?			
Mean \pm SEM of column A	1,037 \pm 0,1117 N=6	0,6807 \pm 0,04984 N=6	0,0 \pm 0,0 N=5
Mean \pm SEM of column B	1,243 \pm 0,1109 N=7	0,6759 \pm 0,06601 N=7	0,5601 \pm 0,1944 N=7
Difference between means	0,2056 \pm 0,1584	-0,004810 \pm 0,08513	0,5601 \pm 0,2333
95% confidence interval	-0,1430 to 0,5541	-0,1922 to 0,1825	0,04026 to 1,080
R squared	0,1328	0,0002901	0,3656
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	1,151, 6, 5	2,047, 6, 5	
P value	0,8966	0,449	
P value summary	ns	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	

Fonte: Da autora

APÊNDICE C – Análise estatística da quantificação de PDILT (Software Prism 6)

Quadro 3- A: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4,223	0,2898	ns	No	
Groups	8,263	0,0317	*	Yes	
Epididymal regions	34,13	0,0003	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,2282	2	0,1141	F (2, 33) = 1,286	P = 0,2898
Groups	0,4465	1	0,4465	F (1, 33) = 5,033	P = 0,0317
Epididymal regions	1,844	2	0,9222	F (2, 33) = 10,39	P = 0,0003
Residual	2,928	33	0,08872		
Number of missing values		3			

Fonte: Da autora

Quadro 3- B: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4,223	0,2898	ns	No	
Groups	8,263	0,0317	*	Yes	
Epididymal regions	34,13	0,0003	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,2282	2	0,1141	F (2, 33) = 1,286	P = 0,2898
Groups	0,4465	1	0,4465	F (1, 33) = 5,033	P = 0,0317
Epididymal regions	1,844	2	0,9222	F (2, 33) = 10,39	P = 0,0003
Residual	2,928	33	0,08872		
Number of missing values		3			

Fonte: Da autora

Quadro 3- C: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Number of families			2					
Number of comparisons per family			3					
Alpha			0,05					
Sidak's multiple comparisons test		Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary			
Control								
Caput vs. Corpus		0,2368	-0,1957 to 0,6693	No	ns			
Caput vs. Cauda		0,6492	0,2167 to 1,082	Yes	**			
Corpus vs. Cauda		0,4123	-0,02018 to 0,8448	No	ns			
Immunocastrated								
Caput vs. Corpus		-0,1004	-0,5009 to 0,3000	No	ns			
Caput vs. Cauda		0,3369	-0,06357 to 0,7373	No	ns			
Corpus vs. Cauda		0,4373	0,03686 to 0,8377	Yes	*			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N 1	N 2	t	DF
Control								
Caput vs. Corpus	0,6492	0,4123	0,2368	0,172	6	6	1,377	33
Caput vs. Cauda	0,6492	0	0,6492	0,172	6	6	3,775	33
Corpus vs. Cauda	0,4123	0	0,4123	0,172	6	6	2,398	33
Immunocastrated								
Caput vs. Corpus	0,6473	0,7477	-0,1004	0,1592	7	7	0,6308	33
Caput vs. Cauda	0,6473	0,3104	0,3369	0,1592	7	7	2,116	33
Corpus vs. Cauda	0,7477	0,3104	0,4373	0,1592	7	7	2,747	33

Fonte: Da autora

Quadro 3- D: Análise estatística da quantificação de PDIA1 (Software Prism 6)

Table Analyzed	Sptz PDILT Caput	Sptz PDILT Corpus	Sptz PDILT Cauda
Column B	Immunocastrated	Immunocastrated	Immunocastrated
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	Control	Control	Control
Unpaired t test			
P value	0,9927	0,0687	0,0245
P value summary	ns	ns	*
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0,009341 df=11	t=2,017 df=11	t=2,605 df=11
How big is the difference?			
Mean ± SEM of column A	0,6492 ± 0,1677 N=6	0,4123 ± 0,09817 N=6	0,0 ± 0,0 N=6
Mean ± SEM of column B	0,6473 ± 0,1193 N=7	0,7477 ± 0,1284 N=7	0,3104 ± 0,1096 N=7
Difference between means	-0,001881 ± 0,2014	0,3354 ± 0,1662	0,3104 ± 0,1192
95% confidence interval	-0,4451 to 0,4413	-0,03050 to 0,7013	0,04818 to 0,5727
R squared	0,000007931	0,2701	0,3816
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	1,694, 5, 6	1,997, 6, 5	
P value	0,5379	0,4649	
P value summary	ns	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	

Fonte: Da autora